

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intellectual  
Oficina internacional



20 JUN 2005

(43) Fecha de publicación internacional  
15 de Julio de 2004 (15.07.2004)

PCT

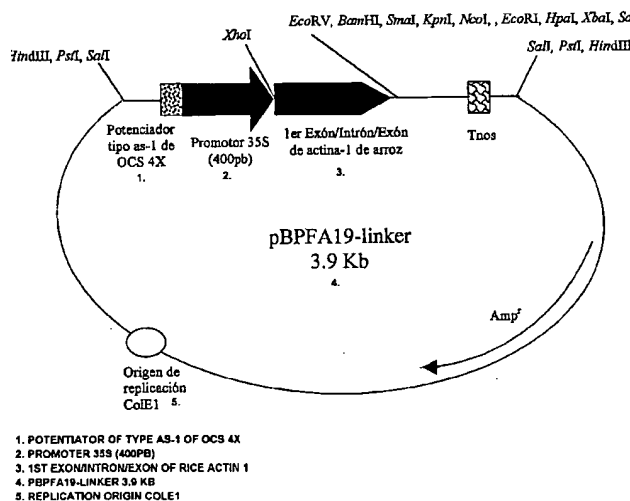
(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2004/058979 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: C12N 15/82
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/CU2003/000018
- (22) Fecha de presentación internacional:  
19 de Diciembre de 2003 (19.12.2003)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
2002-0337  
27 de Diciembre de 2002 (27.12.2002) CU
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTEC-  
NOLOGIA [CU/CU]; Departamento de Patentes, Ave. 31  
entre 158 y 190, Cubanacan, Playa, 10600 Ciudad de La  
Habana (CU).
- (72) Solicitante e
- (72) Inventor: SELMAN-HOUSEIN SOSA, Guillermo  
[CU/CU]; Calle 186 entre 31 y 33, No. 3115, Apto 6A.  
Cubanacán, Playa., 12100 Ciudad de la Habana (CU).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): SALAZAR  
RODRÍGUEZ, Alberto [CU/CU]; Barrutia No. 160 entre  
Pallaré y Cristóbal Guardia. Guanabacoa., 11100 Ciu-  
dad de la Habana (CU). ABREU REMEDIOS, Daymí  
[CU/CU]; Edificio 29, Apto10, entre Garaita y Carretera  
Central, Reparto Roman., 60200 Sancti Spíritus (CU).  
RAMOS GONZÁLEZ, Osmany [CU/CU]; Calle 170  
entre 51 y 59, No. 5137. Lisa., 13500 Ciudad de la Habana  
(CU).
- (74) Mandatario: VAZQUEZ CASTILLO, Mariela; Ave. 31  
entre 158 y 190, Cubanacán, Playa., 10600 Ciudad de La  
Habana (CU).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: ARTIFICIAL PROMOTER FOR THE EXPRESSION OF DNA SEQUENCES IN VEGETAL CELLS

(54) Título: PROMOTOR ARTIFICIAL PARA LA EXPRESIÓN DE SECUENCIAS DE ADN EN CÉLULAS VEGETALES.



(57) Abstract: The invention relates to an artificial promoter which is characterised in that it comprises a chimeric molecule of recombinant DNA which, once introduced into plant cells of any class, promotes high expression levels of any DNA molecule that is fused to the 3' end thereof. The basic genetic elements of the inventive promoter molecule are as follows: a promoter nucleus with a consensus TATA box followed by an Exon/Intron/Exon region and a translational activity-potentiating element, all of which are produced artificially. Transcriptional expression-regulating elements can be inserted upstream of the promoter in order to provide the expression with the specific time-response capacity of organ or tissue. The artificial genetic elements designed can be functionally inserted between any active promoter in plant cells and any DNA sequence in order to increase the transcription/translation levels of the latter.

[Continúa en la página siguiente]

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/058979 A1



(81) **Estados designados (nacional):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados (regional):** patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Declaraciones según la Regla 4.17:**

- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii)) para las siguientes designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv)) sólo para US

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(57) **Resumen:** Un promotor artificial caracterizado porque es una molécula quimérica de ADN recombinante que después de ser introducida en células de plantas de cualquier clase promueve altos niveles de expresión de cualquier molécula de ADN fusionada a su extremo 3'. Los elementos genéticos base de la molécula promotora que aquí se describe son: un núcleo promotor con una caja TATA consenso seguida de una región Exón/Intrón/Exón y de un elemento potenciador de la actividad traduccional construidos todos artificialmente. Elementos reguladores de la expresión transcripcional pueden ser insertados corriente arriba del promotor que aquí se describe para conferir a la expresión capacidad de respuesta temporal, órgano, o tejido específica. Los elementos genéticos artificiales diseñados pueden ser funcionalmente insertados entre cualquier promotor activo en células de plantas y una secuencia cualquiera de ADN, para incrementar los niveles de transcripción/traducción de esta última.

## PROMOTOR ARTIFICIAL PARA LA EXPRESIÓN DE SECUENCIAS DE ADN EN CÉLULAS VEGETALES.

### Campo de la invención

- 5 Esta invención se relaciona con la rama de la Biotecnología y más específicamente con la Ingeniería Genética de las Plantas. En particular, se brindan construcciones quiméricas de ADN con una alta actividad promotora de la transcripción/traducción de cualquier secuencia nucleotídica fusionada a ellas, en células de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas, lo que permite la obtención de plantas transgénicas con altos niveles de
- 10 expresión de genes y secuencias de ADN de interés.

### Arte previo

- La ingeniería genética de las plantas es una tecnología que ha demostrado ser muy productiva para la investigación básica y la producción comercial de nuevos productos
- 15 biotecnológicos (Hammond J. Curr. Top. Microbiol. Immunol 1999, 240:1-19; Simoens C. y Van Montagu M. Reproduction Update 1995, 1:523-542).

- La selección de señales promotoras que garanticen la expresión adecuada, en fortaleza o localización temporal o espacial, de los genes o secuencias de ADN introducidas a las plantas manipuladas genéticamente mediante técnicas de biología molecular, es de vital
- 20 importancia para el éxito de la ingeniería genética de las plantas. Por esta razón, en las últimas dos décadas múltiples esfuerzos han sido dedicados a la búsqueda de promotores y señales capaces de asegurar la expresión que cada transgen requiere. De esta forma, promotores de diferentes orígenes (vegetal, viral, del Ti o Ri de *Agrobacterium*, o quiméricos) han sido evaluados y empleados en la producción de plantas transgénicas.

- 25 Los promotores constitutivos más ampliamente empleados en la manipulación genética de las plantas han sido: el promotor del ARN de 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) (Odell J.T; Nagy F; Chua N.H. Nature 1985, 313:810-812), el promotor nos del gen nopalina sintetasa del plásmido Ti de *A. tumefaciens* (An G; Costa M.A; Mitra A; Ha S; Marton L. Plant Physiol. 1986, 88:547-552); el promotor del gen actina-1 de arroz
- 30 (McElroy D; Zhang W; Cao J; Wu R. Plant Cell 1990, 2:163-171) y el promotor del gen ubiquitina-1 de maíz (Christensen A.H; Sharrock R.A; Quail P.H. Plant Mol. Biol. 1992, 18:675-689). Sin embargo, cada uno de estos sistemas naturales de expresión presenta limitaciones debido fundamentalmente a que sus niveles de expresión no son lo suficientemente altos en plantas de cualquier clase; por ejemplo, la expresión del promotor
- 35 es baja en células de plantas dicotiledóneas y prácticamente indetectable en

- monocotiledóneas, mientras que el promotor 35S del CaMV, el más universalmente utilizado, es mucho más fuerte en células de tabaco que en células de plantas monocotiledóneas (Topfer R; Maas C; Horicke-Grandpierre C; Schell J; Steinbiss H.H. *Methods Enzymol.* 1993, **217**:67-78; Mitsuhashi I; Ugaki M; Hirochika H; Ohshima M; Murakami T; Gotoh Y; y otros. *Plant Cell Physiol.* 1996, **37**:49-59). De la misma forma, los promotores de la actina-1 de arroz y de la ubiquitina-1 de maíz son altamente eficientes en promover la transcripción de los genes colocados bajo ellos en células de plantas monocotiledóneas, pero su actividad promotora en células de tabaco es baja (Schledzewski K; Mendel R.R. *Transgenic Research* 1994, **3**:249-255).
- 10 Con el fin de incrementar los niveles de expresión de las proteínas heterólogas en las plantas transgénicas, se han diseñado múltiples variantes de promotores quiméricos donde se combinan promotores naturales con elementos potenciadores de la transcripción o la traducción. Entre estos elementos potenciadores encontramos por ejemplo: el potenciador traduccional Omega del Virus del Mosaico del Tabaco (TMV), (Gallie D.R; Sleat D.E; Watts J.W; Turner P.C; Wilson T.M.A. *Nucleic Acids Res.* 1987, **15**:3257-3273 ), o del Virus de Grabado del Tabaco (TEV) (Carrington J.C; Freed D.D. *J. Virol.* 1990, **64**:1590-1597); elementos activadores de los promotores de octopina sintasa (Fromm H; Katagiri F; Chua N.H. *Plant Cell* 1989, **1**:977-984), manopina sintasa (Comai L; Moran P; Maslyar D. *Plant Mol Biol.* 1990, **15**:373-381) o 35S (Kay R; Chan A; Daly M; McPherson J. *Science* 1987, **236**:1299-1302); y exones e intrones naturales como el primer intrón de la alcohol deshidrogenasa-1 de maíz (Callis J; Fromm M; Walbot V. *Genes Devel.* 1987, **1**:1183-1200; Last D.I; Brettell R.I.S; Chamberlaine D.A; Chaudhury A.M; Larkin P.J; y otros. *Theor Appl. Gen.* 1991, **81**:581-588), el primer exón/intrón de la sacarosa sintasa-1 de maíz (Maas C; Laufs J; Grant S; Korfhage C; Werr W. *Plant Mol. Biol.* 1991, **16**:199-207), el primer exón/intrón de la actina-1 de arroz (McElroy D; Blowers A.D; Jenes B; Wu R. *Mol. Gen. Genet.* 1991, **231**:150-160), etc. De esta forma surgieron los promotores 2X35S, Mac, Emu y otros (EP0459643; EP0651812), que continúan siendo fuertes fundamentalmente en células vegetales de una clase específica, dicotiledóneas o monocotiledóneas (Schledzewski K; Mendel R.R. *Transgenic Research* 1994, **3**:249-255).
- 30 El desarrollo de promotores fuertes que puedan ser empleados para expresar genes tanto en células de plantas dicotiledóneas como monocotiledóneas ha sido y es tarea relevante para muchos laboratorios no sólo por el reto científico que ello representa, o por el ahorro que implica poder utilizar una única construcción genética para transformar plantas de diversas clases, sino además por la necesidad de contar con sistemas de expresión propios que

faciliten la producción y comercialización de los productos biotecnológicos. Con este fin la solicitud de patente WO9943838 reivindica un promotor sintético basado en una secuencia de la caja TATA hasta el sitio de inicio de la transcripción con un contenido elevado de GC, 64% o más, unida por su región 5' a secuencias potenciadoras de la transcripción tomadas de los promotores 35S, ubiquitina-1 de maíz y octopina sintasa. Por su parte, buscando no sólo expresión en dicotiledóneas y monocotiledóneas, sino además para evitar el silenciamiento dependiente de secuencias homólogas (Park Y.D; Papp I; Moscone E; Iglesias V; Vaucheret H; Matzke A; Matzke M.A. Plant J. 1996, 9:183-194), la solicitud de patente WO0058485 reivindica un promotor artificial derivado de la combinación de secuencias provenientes del genoma de dos virus vegetales, el Virus del Moteado Amarillo de la Comelina (CoYMV) y el Virus del Mosaico Venoso de la Yuca (CsVMV), y de secuencias activadoras originarias del promotor 35S.

El mecanismo mediante el cual diferentes elementos genéticos potencian la transcripción o traducción de secuencias nucleotídicas no está totalmente esclarecido. Así, por ejemplo, se ha reportado que secuencias líderes de diferentes virus de ARN pueden potenciar la traducción de diferentes ARN mensajeros (ARNm) fusionados a ellas independientemente de si sus extremos 5' tienen la estructura de caperuza ( $m^7G(5')ppp(5')N$ ) o no (Sleat D.E; Wilson T.M.A. 1992. Plant virus genomes as sources of novel functions for genetic manipulations. In: T.M.A. Wilson & J.W. Davies (Eds), Genetic engineering with plant viruses. CRC Press, Inc. p.55-113; Gallie D.R; Sleat D.E; Watts J.W; Turner P.C; Wilson T.M. Nucleic Acids Res. 1987, 15:8693-8711). Sin embargo, a excepción de que la estructura secundaria de los ARN de todos estos líderes virales no es compleja, no se ha determinado que existan otros elementos comunes entre las secuencias nucleotídicas de los mismos que puedan responder por sus propiedades potenciadoras de la traducción.

En particular se ha reportado para el fragmento Omega del TMV que sus propiedades potenciadoras de la traducción están relacionadas con la presencia de al menos una copia del octámero ACATTTAC, que se encuentra repetido en su secuencia, y de una región de  $(CAA)_n$  de 25 bases que es el motivo considerado crítico (dos copias de la región  $(CAA)_n$  son suficientes para conferir altos niveles de potenciación) (Gallie D.R; Walbot V. Nucleic Acids Res. 1992, 20:4631-4638). Sin embargo, se ha reportado que la región rica en CA de 28 bases perteneciente al líder del Virus X de la Papa (PVX), no tiene por sí sola propiedades potenciadoras de la traducción (Pooggin M.M; Skryabin K.G. Mol. Gen. Genet. 1992, 234:329-331); mientras que se postula que el pentanucleótido CCACC que forma parte de esta región CA del líder del PVX, podría interactuar complementariamente

con el 3' del ARNr 18S (Tomashevskaya O.L; Solovyev A.G; Karpova O.V; Fedorkin O.N; Rodionova N.P; Morozov S.Y; Atabekov J.G. J. Gen. Virol. 1993, 74:2717-2724)

Para otros líderes virales también han sido determinados algunos elementos de secuencia involucrados en sus actividades potenciadoras de la traducción, como es el caso de la  
5 secuencia CCTTTAGGTT conservada en los líderes de los carlavirus como el Virus S de la Papa (PVS) (Turner R; Bate N; Tewell D; Foster G.D. Arch. Virol. 1994, 134:321-333); y el llamado motivo ICR2 (regiones internas de control de tipo 2), GGTTTCGANTCC, localizado en regiones repetidas de 27 bases del líder del ARN3 del Virus del Mosaico de la Alfalfa (AIMV), de los cuales son necesarios dos para obtener niveles óptimos de  
10 traducción (van der Vossen E.A.G; Neeleman L; Bol J.F. Nucleic Acids Res. 1993, 21:1361-1367).

En el caso del líder del TEV, dos regiones llamadas CIRE-1 y CIRE-2 que se encuentran entre los nucleótidos 28 a 65 y 66 a 118, respectivamente, han sido identificadas como las responsables de las propiedades potenciadoras de la traducción de este líder viral de 148  
15 bases (Niepel M; Gallie D.R. J. Virol. 1999, 73:9080-9088). Sin embargo, dentro de las regiones CIRE no ha sido definido ningún elemento específico que se considere crítico para la actividad potenciadora de este líder viral.

Como anteriormente referimos, los intrones de origen natural y las secuencias adyacentes también han sido ampliamente empleados para potenciar diferentes sistemas de expresión  
20 génica hasta factores de cientos, especialmente cuando el intrón se coloca cerca del extremo 5' del gen en cuestión. Sin embargo, se reporta que la potenciación de la acumulación de los ARN mensajeros mediada por los intrones (IME) depende entre otros factores del origen del intrón, de las regiones exónicas que flanquean el mismo y hasta del tipo de células. Una fuerte IME de la expresión ha sido observada fundamentalmente en células de plantas  
25 monocotiledóneas, no excediendo comúnmente la IME en dicotiledóneas un factor de 2 a 5 veces. Los mecanismos moleculares de la IME no han sido completamente descubiertos (Simpson G.G; Filipowicz W. Plant Mol. Biol. 1996, 32:1-41; Schuler M.A. 1998. Plant pre-mRNA splicing. In: J. Bailey-Serres & D.R. Gallie (Eds), A look beyond transcription: mechanisms determining mRNA stability and translation in plants. American Society of  
30 Plant Physiologists. p. 1-19; Lorkovic.Z.J; Kirk D.A.W; Lambermon M.H.L; Filipowicz W. Trends in Plant Science. 2000, 5:160-167).

Las variaciones de la IME de la expresión que se observa entre células de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, pueden deberse a que existen reconocidas diferencias entre los requerimientos necesarios para que ocurra un procesamiento adecuado de los pre-

ARNm en células de plantas de clases diferentes. De hecho, en las células de plantas monocotiledóneas, a diferencia de lo que ocurre en dicotiledóneas, no es indispensable la existencia de segmentos ricos en AU dentro de los intrones para que ocurra el procesamiento de los mismos; pudiendo además las células monocotiledóneas procesar intrones que contienen estructuras de tallo con horquilla o tienen alto contenido de GC (más de 50%), lo que indica que las células dicotiledóneas no son capaces de procesar intrones con estructuras secundarias complejas ( Goodall G.J; Filipowicz W. The EMBO Journal 1991, 10:2635-2644; Lorkovic Z.J; Kirk D.A.W; Lambermon M.H.L; Filipowicz W. Trends in Plant Science. 2000, 5:160-167). Estas razones pueden explicar, al menos en parte, por qué los sistemas desarrollados hasta ahora, en los cuales se emplea la IME para potenciar artificialmente la expresión de secuencias nucleotídicas de interés, son clase específicos.

Descripción detallada de la invención:

La secuencia promotora de la expresión que se propone en esta invención, contiene un grupo de características propias que de conjunto la distinguen: 1) es funcionalmente universal por cuanto es activa tanto en células de plantas dicotiledóneas como monocotiledóneas, permitiendo la obtención de plantas transgénicas de cualquier clase con altos niveles de expresión de los genes y secuencias de ADN de interés; 2) se basa en una combinación de elementos genéticos ensamblados artificialmente de forma tal que no sólo incrementan los niveles del ARNm de interés mediante IME, sino que además promueven la traducción de los mismos; 3) la ausencia en este promotor de largos fragmentos de ADN de secuencia idéntica a la natural o de origen viral, minimiza el riesgo de silenciamiento de la expresión mediada por ARN homólogos y la posibilidad de que surjan nuevas razas o cepas de virus como consecuencia de la recombinación homóloga *in planta*; 4) la secuencia de la caja TATA hasta el sitio de inicio de la transcripción no tiene que tener necesariamente un elevado contenido de GC; 5) nuestra secuencia promotora es extremadamente versátil ya que diferentes elementos reguladores de la actividad transcripcional pueden ser insertados 5' a ella para conferir a la expresión capacidad de respuesta temporal, órgano, o tejido específica; 6) los elementos genéticos artificiales que la componen también pueden ser funcionalmente insertados entre cualquier promotor activo en células de plantas y una secuencia cualquiera de ADN, para incrementar la transcripción/traducción de esta última.

El diseño de la región quimérica Exón/Intrón/Exón con una alta actividad potenciadora de la acumulación de ARNm en células de plantas de cualquier clase y su integración funcional a un potenciador artificial de la traducción constituyen dos componentes esenciales del

presente objeto de invención, porque nos permiten expresar más eficientemente cualquier secuencia de ADN de interés en las células vegetales.

Es importante aclarar, que cuando decimos que una región, molécula o secuencia de ADN, es artificial o quimérica, nos estamos refiriendo a que la misma ha sido diseñada y fabricada *in vitro* y por lo tanto no existe en la naturaleza ningún elemento genético cuya estructura primaria del ADN sea idéntica a la de ella, independientemente de que algún pequeño fragmento componente suyo tenga origen natural.

Al diseñar un intrón, con sus regiones exónicas adyacentes, capaz de promover la actividad IME de la expresión, hubimos de estudiar qué motivos de secuencia y componentes genéticos eran comunes en aquellos intrones vegetales con reportada actividad potenciadora de la transcripción. Al mismo tiempo hubo de resolverse el reto que representa lograr un adecuado y eficiente procesamiento de este intrón, independientemente de su contenido de GC, en células de plantas de cualquier clase (dicotiledóneas o monocotiledóneas).

Al comparar las secuencias de los intrones de actina-1 de arroz y ubiquitina-1 y sacarosa sintasa-1 de maíz, ampliamente empleados como potenciadores de la transcripción, detectamos la presencia de motivos de secuencia comunes y repetidos en todos ellos (Figura 1). No está demostrado que ninguno de estos motivos en particular sea responsable de la IME que estos intrones confieren, pero el alto nivel de conservación del motivo CTCC (o secuencias homólogas CTC, TCC y TC) en todas estas regiones, así como en las regiones 5' de las cajas TATA de muchos promotores vegetales, indican la posibilidad de que el mismo favorezca la unión de factores transcripcionales que promueven la actividad ARN-polimerasa II. Igualmente la abundancia y conservación de secuencias ricas en C y A en los primeros exones (regiones que quedarán como líderes no traducibles de los ARNm) y en los líderes virales de reportada actividad potenciadora de la traducción, indica que dichas secuencias pudieran promover la estabilidad de los ARNm resultantes y su capacidad para ser traducidos.

Es apropiado destacar que no existe completa demostración científica de ninguna de las hipótesis anteriormente adelantadas, por lo que no es obvio que la construcción de un intrón artificial con sus exones adyacentes, conteniendo repetidamente los motivos de secuencia por nosotros señalados, resulte en una región con una alta actividad potenciadora de la transcripción y acumulación de ARNm; sin embargo, los resultados de nuestro trabajo así lo indican.

A partir del mencionado estudio de comparación entre los diferentes intrones con sus correspondientes exones, decidimos diseñar una región Exón/Intrón/Exón artificial que



combinara aquellos fragmentos de las secuencias de los intrones/exones de actina-1 de arroz y ubiquitina-1 de maíz, ricos en los motivos que consideramos relevantes para promover la actividad IME de la expresión. Al realizar esta tarea, hubo que tener en cuenta que el intrón artificial resultante debía ser procesable en células de plantas dicotiledóneas, para que el mismo pudiera también promover el incremento de la expresión en este tipo de células. Sin embargo, nos encontramos con la dificultad de que los intrones que utilizamos como material de construcción (actina-1 de arroz y ubiquitina-1 de maíz) tienen un alto contenido de GC, estructuras secundarias complejas con abundantes tallos, y sus puntos de ramificación cercanos al aceptor AG del sitio de procesamiento 3' poseen secuencias alejadas del consenso, por lo que difícilmente estos intrones sean eficientemente procesados en células de plantas dicotiledóneas.

A fin de simplificar la estructura secundaria del Exón/Intrón/Exón diseñado por nosotros para facilitar su procesamiento en células de plantas de cualquier clase, decidimos realizarle múltiples cambios puntuales de secuencia, así como insertar en el mismo secuencias tipo UUUUUUAU que activan el procesamiento (Gniadkowski M; Hemmings-Mieszczak M; Klahre U; Liu H.X; Filipowicz W. Nucleic Acids Res. 1996, 24:619-627). Adicionalmente, nuestra secuencia quimérica se fusionó al segundo exón y se insertó dentro del segundo intrón de la actina-1 de maíz (IVS2), para aprovechar que este es altamente procesable en dicotiledóneas (Ej.: tabaco) (Goodall G.J; Filipowicz W. The EMBO Journal 1991, 10:2635-2644). La probable estructura secundaria de cada una de las variantes diseñadas de nuestro éxon/intrón/exón artificial, fue estudiada mediante análisis con ordenador empleando el programa PCFOLD 4.0 (Zuker M. Meth. Enzymology 1989, 180:262-288). Llamamos ART al Exón/Intrón/Exón artificial creado por nosotros.

Como ya se mencionó, el segundo componente relevante del objeto de esta invención es un potenciador traduccional artificial que se fusionó a continuación del exón/intrón quimérico para elevar los niveles de la expresión.

El potenciador artificial de la traducción fue diseñado a partir del análisis de las secuencias y estructuras secundarias de diferentes líderes virales. De este análisis llegamos a la conclusión de que son tres los elementos esenciales en todos estos potenciadores traduccionales: 1) una estructura secundaria muy poco compleja; 2) segmentos de secuencia ricos en C y A; 3) motivos homólogos en más del 83% a la secuencia consenso HCAYYY (H= C ó U ó A; Y= C ó U, ver Tabla 1), expuestos y que con frecuencia se encuentran repetidos y/o en las horquillas de estructuras que tienen un tallo con baja temperatura de fusión.

Tabla 1. Secuencias estructuralmente conservadas en los fragmentos líderes de varios virus ARN (H=C/U/A; Y=C/U).

Líder viral	Secuencia
TMV	ACAUUUAC
TEV (CIRE-1)	GCAUUCUA
TEV (CIRE-2)	UCAUUUCU
PVS	ACCUUUAG
AIMV(ARN3)	UAAUUCG
AIMV(ARN3)	ACUUUUC
PVX	CCAAUUG
BMV	AACAUCGG
RSV	CCAUUCA
Consenso	HCAYYY

5

A partir de las premisas señaladas, diseñamos un potenciador traduccional artificial en el cual secuencias tipo HCAYYY colocadas dentro de sendas estructuras de tallo con horquilla, se insertaron dentro de una secuencia de 45 bases rica en C y A. Este potenciador traduccional artificial no tiene más de un 55 % de homología con los líderes de los virus ARN que sirvieron para obtener las premisas teóricas empleadas en su confección, e incluso, no existe entre ellos ningún segmento de secuencia de más de 6 nucleótidos que sea 100% homólogo. Por esto podemos afirmar que nuestro potenciador artificial no se deriva de ningún potenciador traduccional anteriormente reportado o protegido (EP 0270611), ni contiene secuencias directamente derivadas de ellos.

15 A nuestro potenciador traduccional quimérico se adicionaron sitios de restricción para facilitar su manipulación y la fusión de genes de interés a él. Finalmente, antes de fusionar el nuevo potenciador traduccional al exón/intrón artificial que creamos, su funcionalidad fue comprobada *in vivo*, demostrándose que posee la misma capacidad de potenciar la expresión de un gen quimérico que el fragmento Omega del TMV. Llamamos Eureka a este  
20 potenciador artificial de la traducción creado por nosotros (Figura 2).

Para construir la secuencia promotora objeto de esta invención, se diseñó inicialmente un promotor base formado por una caja TATA consenso (Joshi C.P. Nucleic Acids Res. 1987, 15:6643-6653) a la que se fusionó la región -24 a -4 (a partir del inicio de transcripción) del promotor 35S del CaMV, incorporando a continuación la región -5 a +27 del gen actina-1 de arroz que proveerá el sitio de inicio de la transcripción y una región rica en C y  
25 A. A continuación se fusionó la región +26 a +72 (a partir del inicio de transcripción) del gen ubiquitina-1 de maíz para proveer regiones ricas en AC y TC respectivamente, que conforman un primer exón artificial que se unió al segundo exón de la actina-1 de maíz, 12

bases antes del sitio de procesamiento 5' de su intrón IVS2 y hasta incluir a este último. Múltiples cambios, adiciones o deleciones de bases se realizaron alrededor de esta zona de unión de acuerdo a las predicciones por computadora, para evitar posibles estructuras secundarias que afectaran la maduración del ARN. El intrón artificial diseñado por nosotros se constituyó de: las primeras 54 bases del intrón IVS2, fusionadas a 37 bases de una región 5' del primer intrón de ubiquitina-1 de maíz correspondiente a las bases de +89 a +126 a partir del inicio de transcripción, seguidas de 375 bases del primer intrón de la actina-1 de arroz ( desde la posición +103 hasta la +477 a partir del inicio de transcripción de este gen), fusionadas a 33 bases del 3' del intrón de ubiquitina-1 de maíz ( de la posición +1051 hasta +1083 a partir de su inicio de transcripción), unidas a la segunda mitad del intrón IVS2 de la actina-1 de maíz (de la posición -52 hasta la +5 a partir del sitio de procesamiento 3' de este intrón) y a una secuencia quimérica de 29 bases conteniendo sitios de restricción y una secuencia consenso de inicio de traducción ( Lütcke H.A; Chow K.C; Mickel F.S; Moss K.A; Kern H.F; Scheele G.A. The EMBO Journal. 1987, 6:43-48). La secuencia del Exón/Intrón/Exón artificial ART creado por nosotros se muestra en la Figura 3. Después de comprobar la procesividad del Exón/Intrón/Exón que construimos, mediante pruebas de expresión transiente en células de tabaco y arroz, a su extremo 3' fue fusionado el potenciador traduccional Eureka, pudiendo apreciarse en la Figura 4 la estructura final de la secuencia promotora objeto de esta invención (promotor PARTE).

Se debe destacar que el elemento potenciador ART diseñado por nosotros, se mostró más eficiente como potenciador de la expresión génica que el comúnmente utilizado primer exón/intrón/exón del gen actina-1 de arroz; siendo el fragmento Eureka un potenciador adicional de su actividad.

En este trabajo se logra por vez primera confeccionar de forma artificial dos elementos genéticos muy eficientes como potenciadores de la expresión de cualquier secuencia de ADN en células de plantas transgénicas de cualquier clase, lo que demuestra la validez de los preceptos teóricos en los que nos hemos basado. Por primera vez también se logra que un intrón artificial con un contenido de AT menor de 52 % sea adecuadamente procesado en células de plantas dicotiledóneas, y que promueva en ellas alta actividad IME de la expresión. También constituye una novedad la construcción de un potenciador traduccional completamente artificial, altamente eficiente y de baja homología con los líderes de los virus ARN.

Diferentes regiones activadoras de la transcripción fueron fusionadas 5' a la secuencia promotora objeto de esta invención. Así, la región -43 a -310 (a partir del inicio de

transcripción) del gen actina-1 de arroz fue colocada 5' a nuestro promotor PARTE, como se muestra en la Figura 5, para formar la región promotora APARTE, a la cual se agregaron elementos potenciadores de la transcripción del tipo *as-1* ( Benfey P.N; Chua N.H. Science, 1990, 250:959-966), así como un fragmento de 556 bases de la región 5' del promotor ubiquitina-1 de maíz (de -299 a -855 a partir del inicio de transcripción) para dar finalmente lugar al promotor U3ARTE, cuya estructura se muestra en la Figura 6.

Muchas otras variantes de secuencias promotoras fueron construidas a partir de los elementos genéticos descritos (ver Figura 7), y todas ellas demostraron su funcionalidad en ensayos *in vivo*, comprobándose el efecto sinérgico sobre la expresión de todos los potenciadores y regiones activadoras empleadas.

El elemento *as-1* empleado en nuestras construcciones como potenciador de la transcripción (ver Figura 6) posee un diseño novedoso por cuanto tiene menos de un 50 % de homología con el potenciador palindrómico de la octopina sintasa ( Ellis J.G; Llewellyn D.J; Walker J.C; Dennis E.S; Peacock W.J. EMBO J. 1987, 6:3203-3208; EP0278659), no es idéntico (menos de un 85 % de identidad) a ninguna de las variantes de este tipo de secuencias reivindicadas a partir del estudio hecho por Ellis y colaboradores (Bouchez D; Tokuhisa J.G; Llewellyn D.J; Dennis E.S; Ellis J.G. EMBO J. 1989, 8:4197-4204; USPat. 5,837,849), y los motivos TGACG presentes en él se encuentran dentro de un contexto de secuencias flanqueantes único.

Es importante resaltar que si bien el promotor del gen actina-1 de arroz ha sido descrito y utilizado para expresar diferentes genes (McElroy D; Zhang W; Cao J; Wu R. Plant Cell 1990, 2:163-171; WO9109948), nuestro trabajo revela por vez primera la actividad potenciadora de la transcripción de la región 5' del mismo y su uso como potenciador heterólogo de la transcripción. De la misma forma, aunque el uso de la región 5' activadora de la transcripción del promotor ubiquitina-1 de maíz ha sido reivindicada (EP0342926), el fragmento de 556 bases empleado por nosotros no contiene los elementos de "caja de choque térmico" que se han definido como esenciales para la funcionalidad de este potenciador (se encuentran entre las posiciones -188 y -214 de la secuencia de este promotor), y por lo tanto es original y no obvia la actividad potenciadora de la transcripción de la secuencia del promotor ubiquitina que utilizamos.

El promotor PARTE fue también fusionado a un pequeño fragmento de 214 bases que se corresponde con la región -31 a -245 a partir del inicio de transcripción del gen *gluB-1* de arroz (Takaiwa F; Oono K; Kato A. Plant Mol. Biol. 1991, 16:49-58) para formar la nueva región promotora GARTE ( Figura 8). Ensayos de expresión transiente demostraron que el

nuevo promotor artificial GARTE es altamente eficiente para expresar secuencias de ADN en el endospermo de semillas.

Así concluimos que la combinación funcional de todos estos elementos quiméricos activadores 5' de la transcripción es novedosa y de gran utilidad para producir elementos genéticos que permitan lograr altos niveles de expresión de secuencias de ADN en células vegetales, independientemente de la clase a las cuales ellas pertenezcan.

Es obvio que otras regiones activadoras 5' de diferentes promotores pueden ser fusionadas en *cis* al objeto de esta invención a fin de lograr altos niveles de expresión y/o conferir a la expresión capacidad de respuesta temporal, órgano, o tejido específica.

- 10 Para alguien con experiencia en las técnicas de la ingeniería genética, lo aquí descrito le posibilita el uso de los potenciadores ART y Eureka, en combinación con cualquier elemento promotor de la transcripción en células de plantas, para potenciar la transcripción/traducción de cualquier secuencia de ADN en células vegetales monocotiledóneas o dicotiledóneas. Igualmente, los preceptos teóricos, fruto de nuestras observaciones, que nos llevaron al diseño de ART y Eureka, pueden ser empleados por alguien con experiencia en técnicas de biología molecular para confeccionar nuevos potenciadores de la expresión de secuencias de ADN en células de plantas.

- 20 Considerando el gran desarrollo alcanzado por la ingeniería genética de las plantas en las dos últimas décadas, es obvio que el promotor objeto de esta invención acoplado a un gen cualquiera y a una secuencia terminadora de la transcripción puede ser insertado en un vector para la transformación genética de células vegetales, y mediante técnicas establecidas y de probada eficacia obtener plantas transgénicas que expresen el gen en cuestión.

- 25 Por un vector para la transformación genética se entiende en esta solicitud, una molécula de ADN (purificada, o contenida dentro de una célula bacteriana, o un virus), que sirve como vehículo portador para introducir en una célula vegetal cualquier fragmento de ADN previamente insertado en ella.

#### **Descripción de las Figuras**

- 30 Figura 1. Secuencias de los genes actina-1 de arroz (Act), ubiquitina-1 de maíz (Ubi) y sacarosa sintasa-1 de maíz (Shrun) a partir del inicio de la transcripción. Se muestra el primer exón (en letras mayúsculas) y la región 5' del primer intrón (en minúsculas), y la localización en ellas de motivos de secuencias comunes y repetidos (subrayados).

Figura 2. Secuencia del potenciador traduccional artificial EUREKA, mostrando sus elementos relevantes y los sitios de restricción incluidos.

Figura 3. Secuencia del Exón/Intrón/Exón artificial ART, mostrando el origen de cada uno de sus fragmentos componentes (el intrón artificial está en minúsculas; subrayadas dobles están las bases insertadas para crear secuencias tipo UUUUUAU; se señalan algunos sitios de restricción relevantes (subrayados simples)).

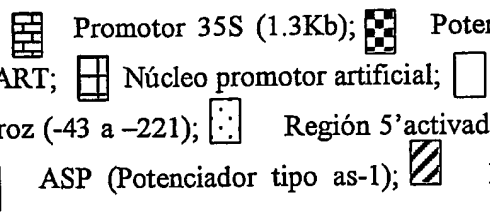







5 Figura 4. Estructura primaria del objeto de esta invención (promotor PARTE), mostrando el promotor base unido al Exón/Intrón/Exón ART y al potenciador traduccional Eureka (en minúsculas itálicas el promotor, y en simples minúsculas el intrón; los exones están en mayúsculas; se señalan algunos sitios de restricción relevantes (subrayados), la caja TATA está doblemente subrayada, y el codón de inicio de traducción está en negritas).

10 Figura 5. Estructura primaria del promotor APARTE, mostrando la región 5' reguladora de la expresión del gen actina-1 de arroz (región -43 a -310 a partir del inicio de transcripción, en mayúsculas-itálicas) unida al promotor PARTE (en minúsculas itálicas el promotor, y en simples minúsculas el intrón; los exones están en mayúsculas; se señalan algunos sitios de restricción relevantes (subrayados), la caja TATA está doblemente subrayada, y el codón de

15 inicio de traducción está en negritas).

Figura 6. Estructura primaria del promotor U3ARTE, mostrando sus elementos componentes: región de -299 a -855 a partir del inicio de transcripción del gen *ubi-1* de maíz, en mayúsculas; potenciador de la transcripción tipo *as-1*, en mayúsculas-negritas; región -43 a -310 a partir del inicio de transcripción del gen act-1 de arroz, en mayúsculas-itálicas; promotor PARTE en minúsculas (en doble subrayado la caja TATA, en itálicas el

20 intrón ART, y en subrayado simple el inicio de traducción)).

Figura 7. Variantes de promotores con los elementos potenciadores objetos de esta invención. A: 35SEureka; B: 35SART; C: 35SARTE; D: PARTE; E: APARTE; F: 2A1PARTE; G: 2APARTE; H: U3ARTE.  Promotor 35S (1.3Kb);  Potenciador traduccional Eureka;  Exón/Intrón/Exón ART;  Núcleo promotor artificial;  Región 5'activadora del gen actina-1 de arroz (-43 a -221);  Región 5'activadora del gen actina-1 de arroz (-226 a -310);  ASP (Potenciador tipo *as-1*);  Región 5'activadora del promotor ubiquitina-1 de maíz (-299 a -855).

25

Figura 8. Estructura primaria del promotor GARTE, mostrando sus elementos componentes: región de -31 a -245 a partir del inicio de transcripción del gen *gluB-1* de arroz, en mayúsculas-itálicas; promotor PARTE (en minúsculas itálicas el promotor, y en simples minúsculas el intrón; los exones están en mayúsculas; se señalan algunos sitios de restricción relevantes (subrayados), la caja TATA está doblemente subrayada, y el codón de

30 inicio de traducción está en negritas).

Figura 9. Mapa del pUC-GUSint.

Figura 10. Mapa del pBPF $\Omega$ 7.

Figura 11. Mapa del pBPFA19-linker.

- Figura 12. Demostración comparativa por tinción histoquímica con X-Gluc de la  
5 funcionalidad de los elementos ART y Eureka en células de arroz mediante la expresión  
transiente de diferentes construcciones genéticas portadoras del gen GUSint, introducidas  
por bombardeo con microprojectiles acelerados.

#### **Depósito de microorganismos**

- 10 Los plásmidos pC-EURGUSint; pC-ARTEGUSint; pGARTEGUSint y pC-  
U3ARTEGUSint fueron depositados bajo el Tratado de Budapest para la protección de  
Microorganismos en el Belgian Coordinated Collections of Microorganism, Plasmid  
Collection (BCCM/LMBP) Universiteit Gent, 'Fiers-Schell-Van Montagu' building,  
Technologiepark 927, B-9052 Gent-Zwijnaarde, Bélgica. Los plásmidos pC-EURGUSint;  
15 pC-ARTEGUSint; pGARTEGUSint con los números de acceso LMBP 4727; LMBP 4725;  
LMBP 4728 respectivamente y con fecha del 19 de mayo, 2003 y el pC-U3ARTEGUSint  
con el número 4791 del 25 de Noviembre del 2003.

#### **EJEMPLOS DE REALIZACIÓN**

- 20 **Ejemplo No.1: Construcción de los elementos constituyentes de un nuevo sistema  
quimérico para la expresión de secuencias de ADN en células de plantas.**

Todos los fragmentos de ADN que se sintetizaron fueron creados con extremos cohesivos a  
diferentes sitios de restricción de endonucleasas tipo II para facilitar la clonación correcta  
de los mismos.

- 25 a) Clonaje del potenciador traduccional Eureka.

El fragmento de ADN de 86 pares de bases (pb) correspondiente al potenciador traduccional  
Eureka (SEQ ID NO: 1), fue clonado en el vector pBluescript II SK (Stratagene, USA)  
previamente digerido con las enzimas *Pst*I y *Sac*I, aprovechando que en el diseño del  
fragmento de ADN sintético se incluyeron extremos cohesivos con ambas enzimas de  
30 restricción. El plásmido resultante de este clonaje fue nombrado pBS-Eureka.

- b) Ensamblaje del Exón/Intrón/Exón artificial ART.

El Exón/Intrón/Exón artificial ART se construyó mediante clonación a partir de ensamblar,  
uno a continuación de otro, los fragmentos de ADN diseñados. Inicialmente, el fragmento  
sintético de ADN llamado P35AcU (SEQ ID NO: 2) que contenía el promotor base, el

primer Exón y parte del Intrón artificial, fue clonado en el vector pBluescript II SK digerido con las enzimas *EcoRI* y *SpeI*, para obtener el plásmido pBS-AcU. A continuación, este último plásmido fue digerido con *SpeI* y *SacI*, y en él se insertó el fragmento de ADN sintético I-U/Ac (SEQ ID NO: 3) que codifica para parte del intrón artificial. Así se obtuvo el plásmido pBS-AcUAc.

Seguidamente, el fragmento sintético de ADN I-Ac/U (SEQ ID NO: 4), conteniendo el final del Intrón artificial fue insertado en el plásmido pBS-AcUAc digerido con las enzimas *BamHI* y *SacI*, para producir el plásmido pBS-AcUAcU.

Al insertar en el plásmido pBS-AcUAcU digerido con *SpeI* y *SacI*, el fragmento IniT (SEQ ID NO: 5), se completó el Exón/Intrón/Exón artificial ART (SEQ ID NO: 6), conformándose el plásmido pBS-ART cuya estructura primaria entre los sitios *EcoRI* y *SacI* del vector pBlueScript II se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 7.

c) Construcción del promotor PARTE.

Para la construcción de la secuencia promotora objeto de esta invención (promotor PARTE), se obtuvo mediante digestión *XhoI* - *PstI* del plásmido pBS-ART el fragmento de ADN que contiene el promotor base y todo el Exón/Intrón/Exón ART sin su región 3', insertándolo en el plásmido pBS-Eureka digerido con estas mismas enzimas. Así logramos el plásmido pPARTE (Figura 4, Figura 7D), cuya secuencia entre los sitios *EcoRI* y *SacI* se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 9.

**20 Ejemplo No.2: Demostración de la funcionalidad de los potenciadores Eureka y ART en células vegetales.**

a) Funcionalidad del potenciador traduccional Eureka en células de tabaco.

Para verificar el poder potenciador de Eureka en células de tabaco y arroz se realizaron una serie de construcciones genéticas auxiliares.

25 El gen reportero *uidA* con el intrón IV2 del gen ST-LS1 de papa insertado en el sitio *SnaBI* (GUSint), fue obtenido mediante digestión *NcoI* - *SacI* a partir del plásmido pUC-GUSint (Figura 9), y clonado en estos mismos sitios del plásmido pBS-Eureka, para dar lugar al vector pBS-EURGUSint. Este último plásmido fue digerido a continuación con las enzimas *PstI* y *SalI* y tratado con la nucleasa S1 para obtener el plásmido pBS-ΔEURGUSint; del cual se obtuvo, mediante digestión *XhoI* - *KpnI*, un fragmento de ADN conteniendo el potenciador Eureka fusionado al gen GUSint que se insertó en el vector pBPFΩ7 (Figura 10). De esta forma obtuvimos el vector pBPF-EURGUSint (Figura 7A), en el cual la expresión del gen GUSint está bajo el control del promotor 35S del CaMV (versión de 1.3



Kb), el potenciador Eureka y las señales de terminación de la transcripción del gen *nos* de *Agrobacterium tumefaciens* (Tnos).

Como control para la evaluación de la expresión de la construcción pBPF-EURGUSint, se construyó el plásmido pBPF $\Omega$ -GUSint, clonando el gen GUSint, obtenido del pUC-GUSint mediante digestión *SaII* / Klenow y *KpnI*, entre los sitios *SmaI* y *KpnI* del vector pBPF $\Omega$ 7. Este plásmido es similar al pBPF-EURGUSint excepto que en lugar del potenciador Eureka, la expresión del gen GUSint está bajo el control del potenciador Omega del TMV.

Otro plásmido control se construyó mediante la eliminación del potenciador Omega de la construcción pBPF $\Omega$ -GUSint, por digestión con *XhoI* – *NcoI*, tratamiento con Klenow y recircularización del plásmido, para obtener el vector pBPF-GUSint.

De los plásmidos pBPF $\Omega$ -GUSint, pBPF-GUSint, y pBPF-EURGUSint fueron obtenidos, mediante digestión con *HindIII*, los casetes para la expresión del gen GUSint en plantas; estos casetes se clonaron en el vector binario pCambia2300, para dar lugar a los plásmidos binarios pC- $\Omega$ 7GUSint, pC-GUSint y pC-EURGUSint, respectivamente.

Después de introducir los plásmidos binarios obtenidos a la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404, procedimos a ensayar la funcionalidad del potenciador Eureka mediante un experimento de expresión transitoria en células de tabaco NT1 según el protocolo descrito por An (An G. Plant Physiol. 1985, 79:568-570) con algunas modificaciones. Después de cocultivar durante 4 días las células de tabaco con el *Agrobacterium* portador de cada vector binario, las células fueron colectadas y procesadas según Jefferson (Jefferson R.A. 1988. Plant reporter genes: the GUS gene fusion system. In: J.K. Setlow (Ed), Genetic Engineering. Vol.10, Plenum Publishing Corporation. p.247-263) para determinar la actividad  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) presente en las mismas. Cada experimento se realizó por triplicado con 5 réplicas por construcción cada vez, y los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Demostración de la funcionalidad del potenciador traduccional Eureka en células de tabaco.

Experimento	Actividad GUS (pM 4-MU/min/mg proteínas totales)				Relación Eureka / $\Omega$	Media de relación Eureka / $\Omega$
	Control de células	pC-GUSint	pC- $\Omega$ 7GUSint	pC-EURGUSint		
I	0.31 $\pm$ 0.01	1.93 $\pm$ 1.17	7.15 $\pm$ 2.26	7.50 $\pm$ 2.60	1.04	1.00 $\pm$ 0.33
II	1.10 $\pm$ 0.28	2.11 $\pm$ 0.18	8.56 $\pm$ 1.60	11.22 $\pm$ 2.80	1.31	
III	0.79 $\pm$ 0.19	4.84 $\pm$ 1.66	33.2 $\pm$ 3.6	21.1 $\pm$ 6.1	0.64	

Como se observa en los resultados expuestos en la Tabla 2, no existen diferencias significativas en cuanto a la actividad potenciadora del fragmento Eureka y la del líder Omega del TMV, por lo que se demuestra que hemos logrado por vez primera un eficiente potenciador traduccional completamente artificial. Así se confirman también nuestros  
5 presupuestos teóricos de que es posible construir un elemento genético con significativas propiedades potenciadoras de la traducción de las secuencias de ADN fusionadas a continuación de él en dirección 3', mediante la combinación de regiones de secuencias ricas en C y A, con secuencias homólogas al motivo HCAYYY (H=C/T/A; Y=C/T).

b) Funcionalidad del Exón/Intrón/Exón artificial ART en células de tabaco.

10 Para comprobar la funcionalidad del elemento ART en células de tabaco, inicialmente se obtuvo el fragmento GUSint del pUC-GUSint mediante digestión con *NcoI* - *SacI*, y se clonó en el pBS-ART digerido con estas mismas enzimas, para dar lugar al plásmido pBS-ARTGUSint. Seguidamente, este último plásmido fue digerido con *SaII* - *BglII* y tratado con nucleasa S1, para dar lugar al pBS-ΔARTGUSint, de donde el fragmento ARTGUSint  
15 fue obtenido por digestión *XhoI* - *KpnI* y clonado en el vector pBPFΩ7 digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido pBPFARTGUSint (Figura 7B), donde la expresión del gen *gus* está bajo el control del promotor 35S del CaMV (versión de 1.3 Kb), el Exón/Intrón/Exón ART y las señales de terminación de la transcripción del gen *nos* de *A. tumefaciens* (Tnos).

20 Del plásmido pBS-ΔARTGUSint, fue obtenida mediante digestión *XhoI* - *PstI*, la banda que contiene el elemento ART y la misma se fusionó al vector PBS-EURGUSint digerido de la misma forma, para obtener el plásmido pBS-ARTEGUSint. De este último plásmido se obtuvo por digestión *XhoI* - *KpnI* un fragmento de ADN conteniendo el gen GUSint bajo las señales de los elementos genéticos ART y Eureka, que se introdujo en el vector pBPFΩ7  
25 digerido de igual forma, para producir el plásmido pBPFARTEGUSint (Figura 7C).

De los plásmidos pBPFARTGUSint y pBPFARTEGUSint fueron obtenidos, mediante digestión con *HindIII*, los casetes para la expresión del gen GUSint en plantas; estos casetes se clonaron en el vector binario pCAMBIA2300, para dar lugar a los plásmidos binarios pC-ARTGUSint y pC-ARTEGUSint, respectivamente.

30 Después de introducir los plásmidos binarios obtenidos en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, procedimos a ensayar la funcionalidad del potenciador Eureka en experimentos de expresión transitoria empleando células de tabaco NT1, según se describió en la sección (a) de este mismo Ejemplo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Demostración de la funcionalidad de los elementos genéticos ART y Eureka en células de tabaco.

Experimento	Actividad GUS (pM 4-MU/min/mg proteínas totales)				Relación 35SART / 35S	Relación 35SARTE/ 35S
	Control de células	pC-GUSint	pC- ARTGUSint	pC- ARTEGUSint		
I	1.13±0.27	4.39±0.96	5.26±1.69	26.3±3.5	1.2	6.0
II	1.77±0.58	6.11±2.45	12.92±2.36	32.0±6.1	2.1	5.2
III	0.69±0.30	2.46±0.77	3.94±1.14	13.5±2.8	1.6	5.5
Media±DS					1.63±0.33	5.57±0.29

- 5 Los resultados de la evaluación de la funcionalidad de ART en células de tabaco demuestran que el intrón artificial es correctamente procesado y tiene actividad potenciadora de la expresión en células de plantas dicotiledóneas. Nuestros resultados experimentales también demuestran el sinergismo positivo sobre los niveles de expresión que se obtiene de la interacción de los elementos ART y Eureka en la construcción
- 10 pBPFARTEGUSint, donde se logra superar en más de 5 veces la capacidad de expresión del conocido promotor natural 35S del CaMV.

- También se prueba que los elementos genéticos artificiales que diseñamos (ART y Eureka) pueden ser funcionalmente insertados entre un promotor cualquiera que sea activo en células de plantas (en este caso el 35S del CaMV) y una secuencia cualquiera de ADN (aquí
- 15 el gen GUSint), para incrementar la transcripción/traducción de esta última.

c) Funcionalidad de los potenciadores Eureka y ART en células de arroz.

- Un grupo de nuevas construcciones fueron realizadas para probar la funcionalidad de nuestros potenciadores artificiales en células de plantas monocotiledóneas. Inicialmente, el fragmento *XhoI* - *KpnI* del plásmido pBPFARTGUSint, conteniendo el gen *uidA* (*gus*)
- 20 fusionado en su extremo 5' al Exón/Intrón ART, fue insertado en el vector pBPFA19-linker (Figura 11) digerido con las mismas enzimas de restricción, para formar el plásmido pBPFA19ARTGUSint. En este último plásmido se ha sustituido el exón/intrón/exón de la actina-1 de arroz, presente en el pBPFA19-linker, por el elemento artificial ART, quedando como los otros elementos reguladores de la expresión el promotor quimérico A19 ( que
- 25 consiste en la combinación del potenciador tipo *as-1* de la octopina sintasa cuatriplicado unido al promotor 35S del CaMV (versión de 400 pb)) y el terminador de la transcripción Tnos.

- De la misma forma, la banda *XhoI* - *KpnI* del plásmido pBS-ARTEGUSint, fue clonada en el vector pBPFA19-linker, para obtener la construcción pBPFA19ARTEGUSint.
- 30 Adicionalmente, una construcción control, pBPFA19GUSint, fue realizada clonando el

fragmento GUSint del plásmido pUC-GUSint en el vector pBPFA19-linker digerido con *Nco*I y *Sac*I. Otro plásmido empleado como control fue el pBPFFΩ-GUSint.

La evaluación cualitativa de la capacidad de ART y Eureka como potenciadores de la expresión génica en células de arroz, se realizó mediante ensayos de expresión transitiva en callos de la variedad índica Perla. Los callos fueron obtenidos a partir de semillas maduras previamente esterilizadas con hipoclorito de sodio y alcohol, y cultivadas por 21 días en la oscuridad en el medio N6-2 (Sales y vitaminas del medio N6 (Chu C.C; y otros. Scientia Sinica 1975, 18:659); 0.1g/L de mio-inositol; Hidrolizado de caseína 1 g/L; 2,4 D a 2mg/L; Sacarosa 30g/L; Fitagel 3g/L, pH 5.7). La transformación se realizó por bombardeo con microproyectiles; y antes del bombardeo los callos se subcultivaron en el medio N6-2 suplementado con 0.4 M de manitol para el pre-tratamiento osmótico. Los microproyectiles para el bombardeo se preparan empleando partículas esféricas de oro de 1 μm (BioRad), según protocolo publicado (Russell D.R., Wallace K.M., Bathe J.H., y otros. Plant Cell Rep. 1993, 12:165-169). La transformación se realiza empleando el sistema PDS-1000/He de Biorad. Para el disparo se colocan 30 callos en el centro de la placa para ser bombardeados con las siguientes condiciones: 1100 psi de presión, 6 cm de distancia y un disparo por placa. Después del disparo los callos permanecen en el mismo medio osmótico por 16 horas en la oscuridad y a continuación se subcultivan 2 días en medio N6-2 sin manitol. La actividad GUS es revelada con X-Gluc según el método histoquímico (Jefferson R.A. 1988. Plant reporter genes: the GUS gene fusion system. In: J.K. Setlow (Ed), Genetic Engineering. Vol.10, Plenum Publishing Corporation. p.247-263). La evaluación se realiza con la ayuda de un estereomicroscopio mediante el conteo de los puntos y zonas teñidas de azul en cada callo (Figura 12). Los resultados obtenidos después de 4 experimentos con 3 réplicas se muestran a continuación en la Tabla 4.

25

Tabla 4. Demostración comparativa de la funcionalidad de los elementos ART y Eureka en células de arroz.

Experimento	% de callos con zonas y puntos azules			
	pBPFFΩ-GUSint	pBPFA19GUSint	pA19ARTGUSint	pA19ARTEGUSint
I	40	60	100	100
II	43	80	93	97
III	33	70	87	90
IV	27	83	93	90
Media±DS	36±6	73±8	93±3	94±4

Como se puede apreciar, estos resultados experimentales confirman también la funcionalidad de ART y Eureka como elementos potenciadores de la expresión génica en células de plantas monocotiledóneas. Es importante resaltar que en nuestros ensayos, la actividad IME demostrada por el Exón/Intrón/Exón artificial ART (pA19ARTGUSint) fue superior a la del primer exón/intrón/exón de la actina-1 de arroz (pBPFA19GUSint), siendo este último un elemento genético de reconocida capacidad potenciadora de la expresión génica. Adicionalmente, aunque en nuestros experimentos no se observa una apreciable diferencia entre los resultados obtenidos con las construcciones pA19ARTGUSint y pA19ARTEGUSint, si observamos la Figura 12 podremos notar que la presencia del fragmento Eureka en esta última construcción aumenta significativamente la expresión, ya que fueron mucho más grandes e intensas las zonas reveladas por la tinción histoquímica con X-Gluc en los callos bombardeados con el pA19ARTEGUSint.

A modo de conclusión, con el presente Ejemplo demostramos la funcionalidad de los elementos genéticos artificiales ART y Eureka como potenciadores de la expresión génica en células de plantas de cualquier clase. Adicionalmente se demostró que estos elementos potenciadores son altamente eficientes e incrementan los niveles de expresión independientemente del promotor a que sean fusionados los mismos. Finalmente, también demostramos que ART y Eureka pueden combinarse para de forma sinérgica potenciar aún más la expresión de aquellos genes colocados bajo ellos.

Nuevamente se demuestra que ART y Eureka pueden ser funcionalmente insertados entre cualquier promotor activo en células de plantas (el A19 por ejemplo) y una secuencia cualquiera de ADN (el gen GUSint), para incrementar la transcripción/traducción de esta última.

**Ejemplo No. 3: Variantes del sistema de expresión PARTE, empleando diferentes regiones 5' activadoras de la transcripción.**

a) Adición al promotor PARTE de la región 5' activadora de la transcripción del gen actina-1 de arroz.

Para fusionar en *cis* al promotor PARTE la región 5' activadora de la transcripción del gen actina-1 de arroz, el plásmido pPARTE fue digerido con las enzimas EcoRI y EcoRV, y en él se insertó el fragmento de ADN sintético En-Ac1 (de -43 a -221 a partir del inicio de transcripción del gen actina-1 de arroz; SEQ ID NO: 10) con extremos que ligan con las enzimas en cuestión. Así obtuvimos el plásmido pAIPARTE, el cual se digirió con EcoRV y HindIII para insertarle el fragmento de ADN sintético En-Ac2 (-226 a -310 a partir del inicio de transcripción del gen actina-1 de arroz; SEQ ID NO: 11) que completa la región 5'

activadora del promotor del gen actina-1 de arroz, y obtenemos así el plásmido pAPARTE (Figura 5, Figura 7E) cuya secuencia nucleotídica entre los sitios *HindIII* y *SacI* se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 12.

b) Adición al promotor APARTE de secuencias potenciadoras de la transcripción tipo *as-1*.

- 5 El plásmido pA1PARTE se digirió con *NruI* y *SalI* y en él se insertó el fragmento sintético de ADN llamado ASP (SEQ ID NO: 13), que posee sitios cohesivos a las enzimas de restricción empleadas y codifica para una secuencia potenciadora de la transcripción tipo *as-1*, produciendo de esta forma la construcción pASPΔA1PARTE. Este último plásmido fue digerido con *SalI*, tratado con nucleasa S1 y vuelto a digerir con *PstI* para obtener un
- 10 fragmento de ADN de aproximadamente 900 pares de bases que fue clonado en el vector pA1PARTE digerido con *NruI* y *PstI*, para finalmente obtener el plásmido pASPA1PARTE, que tiene insertado el potenciador ASP en el sitio *NruI* de la región 5' activadora de la transcripción de la actina-1 de arroz. Mediante digestión *EcoRV* – *XhoI*, se insertó un segundo potenciador ASP al plásmido pASPA1PARTE, para obtener el vector
- 15 p2A1PARTE (ver secuencia nucleotídica de este plásmido entre los sitios *KpnI* y *SacI* en la secuencia SEQ ID NO: 14), Figura 7F.

- Al plásmido pASPA1PARTE, se insertó el fragmento sintético En-Ac2, tal y como se hizo al plásmido pA1PARTE, y obtuvimos la construcción pASPAPARTE a la que un segundo potenciador ASP se insertó mediante digestión *EcoRV* – *SalI* obteniéndose finalmente el
- 20 vector p2APARTE (Figura 7G). La secuencia nucleotídica del p2APARTE entre los sitios *SalI* y *SacI* se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 15.

c) Construcción del promotor U3ARTE.

- Inicialmente se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los oligonucleótidos cebadores Oli-U1 (SEQ ID NO: 16) y Oli-U2 (SEQ ID NO: 17), un
- 25 fragmento de ADN de aproximadamente 395 pb correspondiente a la región de -299 hasta -680 a partir del inicio de transcripción del gen *ubi-1* de maíz). El fragmento amplificado se digirió con las enzimas *KpnI* y *XhoI* (sitios ambos incluidos en los cebadores) y clonó en el vector pBluescript II SK, igualmente procesado, para obtener la construcción pBS-Ubi1. Seguidamente, un fragmento sintético de ADN (En-U2) que codifica para la región de -680
- 30 hasta -855 del gen *ubi-1* de maíz ( secuencia SEQ ID NO: 18) fue clonado en el vector pBS-Ubi1 digerido con las enzimas *NcoI* y *KpnI*, conformándose la construcción pBS-Ubi2 que contiene la región 5' activadora de la transcripción del promotor ubiquitina-1 de maíz (de -299 a -855, secuencia SEQ ID NO: 19).

El fragmento clonado de la región 5' activadora de la transcripción del gen ubiquitina-1 de maíz, que no contiene las "cajas de choque térmico", fue obtenido del plásmido pBS-Ubi2 mediante digestión *XhoI* – *KpnI*, e insertado en *cis* 5' al promotor 2APARTE por digestión *SaII* – *KpnI* del vector, para obtener la construcción que llamamos pU3ARTE (Figura 6, 5 Figura 7H). La secuencia del vector pU3ARTE entre los sitios *KpnI* y *SacI* se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 20.

d) Construcción del promotor GARTE.

Para demostrar la plasticidad del objeto de esta invención, decidimos comprobar que la fusión al mismo de regiones regulatorias 5' de promotores con respuesta temporal, órgano, 10 o tejido específica, le confiere la capacidad de lograr altos niveles de expresión con estas características. Así, la región 5' regulatoria del gen *gluB-1* de arroz que controla la órgano-especificidad de la expresión de la glutelina, fue fusionada en *cis* y 5' al promotor PARTE. Para esto se sintetizó un fragmento de ADN de 214 bases (GLU) que se corresponde con la región -31 a -245 a partir del inicio de transcripción del gen *gluB-1* (SEQ ID NO: 21) y 15 convenientes sitios de clonaje, para insertarlo en el plásmido pPARTE digerido con *EcoRI* y *XhoI*, produciendo el vector pGARTE (Figura 8), cuya estructura primaria entre los sitios *XhoI* y *SacI* se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 22.

**Ejemplo No.4: Funcionalidad de las diferentes variantes del sistema de expresión PARTE en células de tabaco y arroz.**

20 Para evaluar en células de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas los niveles de expresión promovidos por cada una de las variantes del promotor objeto de esta invención, se eliminó mediante digestión *SmaI* – *SpeI* el promotor 35S del CaMV que controla la expresión del gen GUSint en el vector binario pC-ARTEGUSint, y en su lugar se insertó el fragmento *KpnI* / nucleasa S1 – *SpeI* de cada una de las construcciones pAPARTE, 25 p2A1PARTE, p2APARTE y pU3ARTE, para producir los nuevos vectores binarios pC-APARTEGUSint, pC-2A1PARTEGUSint, pC-2APARTEGUSint y pC-U3ARTEGUSint.

a) Ensayo en tabaco.

Los vectores binarios pC-APARTEGUSint, pC-2A1PARTEGUSint, pC-2APARTEGUSint y pC-U3ARTEGUSint fueron introducidos a células de *A. tumefaciens* para realizar 30 experimentos de expresión transiente en células de tabaco NT1, según se describió en la sección (a) del Ejemplo No.2. Como plásmido control se empleó el pC-GUSint donde la expresión del gen *gus* esta bajo el control del promotor 35S del CaMV (versión de 1.3 Kb) y el terminador Tnos. Los experimentos se realizaron por duplicado (con cinco réplicas para cada tratamiento) y los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 5. Funcionalidad de las diferentes variantes del sistema de expresión PARTE en células de tabaco.

Experimento	Actividad GUS (pM 4-MU/min/mg proteínas totales)					
	Control de células	pC-GUSint	pC-APARTE GUSint	pC-2A1PARTE GUSint	pC-2APARTE GUSint	pC-U3ARTE GUSint
I	0.46±0.37	3.55±1.23	4.89±1.67	23.1±6.9	28.4±5.8	29.2±6.1
II	1.30±0.81	7.02±2.78	6.63±4.26	24.7±4.2	21.0±4.3	32.6±9.0

- 5 Es evidente que nuestros resultados corroboran la funcionalidad de las diferentes variantes promotoras del objeto de esta invención, mostrando además que es posible modular la actividad del mismo en dependencia de las regiones 5' activadoras de la transcripción que sean fusionadas a PARTE. Es de resaltar que con nuestras construcciones genéticas logramos en células de plantas dicotiledóneas niveles de expresión superiores a los alcanzados por el promotor natural 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor.

b) Ensayo en arroz.

- Los vectores binarios pC-APARTEGUSint, pC-2A1PARTEGUSint, pC-2APARTEGUSint y pC-U3ARTEGUSint fueron bombardeados a callos de arroz según se describió en la sección (c) del Ejemplo No. 2, para evaluar la actividad de los diferentes promotores PARTE en células de plantas monocotiledóneas mediante ensayos de expresión transiente.
- Como plásmido control se empleó el pAct1-F (McElroy D; Zhang W; Cao J; Wu R. Plant Cell 1990, 2:163-171) donde la expresión del gen *gus* está bajo el control del promotor del gen actina-1 de arroz y el terminador Tnos. De este plásmido se extrajo el casete de expresión mediante digestión *KpnI* - *XbaI* y se insertó en el plásmido binario pCAMBIA2300 digerido con estas mismas enzimas, para producir el vector pC-Act1F.

Los experimentos de bombardeo se realizaron por triplicado con 3 réplicas para cada construcción a evaluar. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6. Funcionalidad de diferentes variantes del sistema de expresión PARTE en células de arroz.

Experimento	% de callos con zonas y puntos azules				
	pC-Act1F	pC-APARTE GUSint	pC-2A1PARTE GUSint	pC-2APARTE GUSint	pC-U3ARTE GUSint
I	67	73	92	100	100
II	63	88	95	91	92
III	81	85	90	87	100
Media±DS	70±4	82±6	92±2	93±5	97±4



Los resultados que muestra la tabla anterior certifican la funcionalidad de las diferentes variantes del promotor PARTE en células de plantas monocotiledóneas, lográndose con ellas niveles de expresión superiores al promotor natural del gen actina-1 de arroz. Así, se corrobora la utilidad del objeto de la presente invención como herramienta genética útil para  
 5 lograr en células de plantas de cualquier clase altos niveles de expresión de cualquier secuencia de ADN colocada en *cis* bajo su control.

c) Ensayo en semillas de arroz.

Para evaluar la tejido especificidad del promotor GARTE en endospermos de semillas de arroz, el fragmento *SaII* / Klenow – *PstI* de aproximadamente 2.5 Kb del vector  
 10 pBPFARTEGUSint, que contiene el fragmento Eureka fusionado al gen GUSint con el terminador nos (Tnos), se clonó en el vector pGARTE digerido con *XbaI* / Klenow – *PstI* para formar la construcción pGARTEGUSint.

También se construyó un plásmido control sustituyendo el promotor GARTE en el pGARTEGUSint, mediante digestión *XhoI* – *NcoI*, por un promotor altamente eficiente en  
 15 el endospermo de semillas como el promotor del gen de la glutelina B-1 de arroz, obtenido del plásmido pGEM-T-GluB-1prom por digestión *SaII* – *NcoI*. Así se obtuvo el pGluGUSint.

Las evaluaciones del promotor GARTE en comparación con el GluB-1, se realizaron según Y-S. Hwang ( Hwang Y-S; McCullar Cass; Huang N. Plant Science. 2001, 161:1107-1116)  
 20 mediante el bombardeo de endospermos inmaduros ( 8-9 días después de la polinización) aislados de los cariopsis de las espigas de la variedad de arroz indica Perla cultivada en invernadero. El ensayo fluorométrico para determinar la actividad GUS en los endospermos fue realizado según Jefferson (Jefferson R.A. 1988. Plant reporter genes: the GUS gene fusion system. In: J.K. Setlow (Ed), Genetic Engineering. Vol.10, Plenum Publishing  
 25 Corporation. p.247-263) 24 horas después del bombardeo con micropartículas de oro recubiertas con el ADN de los plásmidos a evaluar. Los resultados de la actividad GUS obtenidos en dos experimentos independientes con 5 réplicas cada uno se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Funcionalidad del promotor GARTE en endospermo de semillas de arroz.

30

Experimento	Actividad GUS (pM 4-MU/hr/mg proteínas totales)		Relación GARTE/GluB-1
	pGluGUSint	pGARTEGUSint	
I	34±9	79±22	2.3
II	27±5	52±13	1.9

Estos resultados confirman que el promotor quimérico GARTE basado en los elementos artificiales diseñados por nosotros es altamente eficiente para expresar genes en el endospermo de semillas; ya que aunque la secuencia GLU insertada en el promotor GARTE es capaz de conferir especificidad a la expresión, ella por si sola no garantiza altos niveles de la misma porque estos van a depender además de otros elementos constituyentes del promotor en cuestión ( Takaiwa F; Yamanouchi U; Yoshihara T; Washida H; Tanabe F; Kato A; Yamada K. Plant Mol Biol. 1996, 30:1207-1221).

Más aún, los datos mostrados reafirman que la inserción de secuencias reguladoras corriente arriba al elemento objeto de esta invención permite que el mismo sea empleado para conducir eficientemente la expresión de cualquier secuencia de ADN de forma temporal, órgano o tejido específica. Es obvio para alguien con conocimientos en biología molecular de plantas, que las secuencias regulatorias del promotor GluB-1 insertadas en el promotor GARTE, pueden ser exitosamente sustituidas por secuencias reguladoras que respondan a estrés biótico como por ejemplo el ataque de patógenos, abióticos como heridas, temperaturas, salinidad, sequía, o a la presencia de determinadas sustancias químicas, o a estreses oxidativos, o a diferentes estadios de desarrollo de los órganos y tejidos de la planta, etc.

Es evidente además, que las secuencias de ADN clonadas bajo las señales reguladoras objeto de esta invención pueden ser introducidas en células vegetales e insertadas establemente en ellas mediante conocidos métodos biológicos o físico-químicos de transformación, y que a partir de estas células modificadas genéticamente es posible regenerar plantas fértiles en las cuales las secuencias de ADN de interés se expresarán convenientemente según la variante de promotor que hayamos fusionado a ella. Así, la presente invención revela su potencialidad para contribuir a la producción de plantas transgénicas con mayores niveles de resistencia a plagas, enfermedades, estreses de diferentes tipos, mayores rendimientos agrícolas, o altamente eficientes en producir compuestos de uso médico o industrial, entre otros.

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
- 5 <120> Promotor artificial para la expresión de secuencias de ADN en células vegetales.
- <130> Promotor artificial
- 10 <140> 0000  
<141> 2002-11-18
- <160> 22
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1  
<211> 86  
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
Potenciador traduccional Eureka.
- 25 <400> 1  
gaaacaaatt gaacatcatt ctatcaatac aacacaaaca caacacaact caatcattta 60  
tttgacaaca caactaaaca accatg 86
- 30 <210> 2  
<211> 198  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
Fragmento sintético P35AcU.
- 40 <400> 2  
gaattctata tataggaagt tcatttcatt tggagcccc caaccctacc accaccacca 60  
ccaccacctc ctcttcaca caacacacac acaacagatc tccccatcc tccctcccg 120  
cgcgccgcgc aacacctggt aagatggctg tgcgctcaga tatatatagt gatatgcact 180  
acaaagatca taactagt 198
- 45 <210> 3  
<211> 231  
<212> ADN
- 50 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
Fragmento sintético I-U/Ac.
- 55 <400> 3  
ctagaccgcc gectcccccc cccccctct ctaccttctc tttttcttct tccggttttt 60  
ttttccgtct cgtctcgatc tttggccttg gtagtttggg ggcgagaggc ggcttcgctc 120  
cccagatcgg tgcgcgtttt tttatttgga gggcgggat ctgcggtg ggtctcggcg 180  
60 tgcggccgga ttctcgcggg gaatggggct ctcgatgtg gatccgagct c 231

<210> 4  
 <211> 255  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Fragmento sintético I-Ac/U.

10 <400> 4  
 gatctgatcc gccgttggtg ggggagatat ggggcgttta aaatttcgcc atgctaaaca 60  
 agatcaggaa gaggggaaaa gggcactatg gtttaatttt tatatatattc tgctgctgct 120  
 cgtcaggatt agatgtgctt gatctttctt tcttcttttt gtgggtagaa tttgaatccc 180  
 15 tcagcattgt tcatcggtag tttttctttt gtcgatgctc accctgttgt ttggtgtttt 240  
 tatactagtg agctc 255

<210> 5  
 20 <211> 93  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Fragmento sintético IniT.

<400> 5  
 30 ctagtggcta tcctgacacg gtctctttgt caaatatctc tgtgtgcagg tataactgca 60  
 ggaaacaaca acaataacca tgggtctagag ctg 93

<210> 6  
 <211> 692  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 40 Exón/Intrón/Exón artificial ART.

<400> 6  
 accaccacca ccaccaccac ctctctcttc acacaacaca cacacaacag atctccccc 60  
 tcctccctcc cgtcgcgcgc cgcaacacct ggtaagatgg ctgtgcgctc agatatatat 120  
 45 agtgatatgc actacaaaga tcataactag accgccgcct ccccccccc cctctcttac 180  
 cttctctctt tctttctccg tttttttttt ccgtctcgtc tcgatctttg gccttggtag 240  
 tttgggggag agaggcggtc tcgtcgccca gatcggtgcg cgttttttta tttggagggg 300  
 cgggatctcg cggctgggtc tcggcgtgcg gccggattct cgcggggaat ggggctctcg 360  
 gatgtggatc tgatccgcgc ttgttggggg agatatgggg cgtttaaaat ttcgccatgc 420  
 50 taaacaagat caggaagagg ggaaaagggc actatggttt aatttttata tatttctgct 480  
 gctgctcgtc aggattagat gtgcttgatc tttctttctt ctttttgttg gtagaatttg 540  
 aatccctcag cattgttcat cggtagtttt tcttttgtcg atgctcacc tgttggttgg 600  
 tgtttttata ctagtggcta tcctgacacg gtctctttgt caaatatctc tgtgtgcagg 660  
 tataactgca ggaaacaaca acaataacca tg 692  
 55

<210> 7  
 <211> 750  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>

## &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial:

Secuencia del vector pBS-ART entre los sitios EcoRI y SacI.

&lt;400&gt; 7

```

5  gaattctata tataggaagt tcatttcatt tggagccccc caaccctacc accaccacca 60
   ccaccacctc ctccctcaca caacacacac acaacagatc tcccccatcc tccctcccgt 120
   cgcgccgcgc aacacctggt aagatggctg tgcgctcaga tatatatagt gatatgcact 180
   acaaagatca taactagacc gccgcctccc cccccccccc tctctacctt ctctctttct 240
10  ttctccgttt tttttttccg tctcgtctcg atctttggcc ttggtagttt gggggcgaga 300
   ggcggtctcg tcgcccagat cgggtgcgctg ttttttatth ggaggggcgg gatctcgcgg 360
   ctgggtctcg gcgtgcggcc ggattctcgc ggggaatggg gctctcggat gtggatctga 420
   tccgccgttg ttgggggaga tatggggcgt ttaaaatttc gccatgctaa acaagatcag 480
   gaagagggga aaagggcact atggtttaat ttttatatat ttctgctgct gctcgtcagg 540
   attagatgtg cttgatcttt ctttcttctt tttgtgggta gaatttgaat ccctcagcat 600
15  tgttcatcgg tagtttttct tttgtcgatg ctcaccctgt tgtttggtgt ttttatacta 660
   gtggctatcc tgacacggtc tctttgtcaa atatctctgt gtgcaggtat aactgcagga 720
   aacaacaaca ataaccatgg tctagagctc 750

```

20 &lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 757

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

25 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial:

Exón/Intrón/Exón artificial ARTE.

&lt;400&gt; 8

```

30  accaccacca ccaccaccac ctctctcttc acacaacaca cacacaacag atctccccc 60
   tctccctcc cgtcgcgcgc cgcaacacct ggtaagatgg ctgtgcgctc agatatatat 120
   agtgatatgc actacaaaga tcataactag accgccgcct cccccccccc ccctctctac 180
   ctctctctct tctttctcgc tttttttttt ccgtctcgtc tcgatctttg gccttggttag 240
   tttgggggag agaggcggtc tcgtcgccca gatcggtgag cggtttttta tttggagggg 300
35  cgggatctcg cggctgggtc tcggcgtgag gccggattct cgcggggaat ggggctctcg 360
   gatgtggatc tgatccgcgc ttgttggggg agatatgggg cgttttaaata ttcgccatgc 420
   taaacaagat caggaagagg ggaaggggc actatgggtt aatttttata tatttctgct 480
   gctgctcgtc aggatagat gtgcttgatc tttctttctt ctttttggg gtagaatttg 540
   aatccctcag cattgttcat cggtagtttt tcttttgcg atgctcacc tggtgttttg 600
40  tgtttttata ctagtgggta tcctgacacg gtctctttgt caaatatctc tgtgtgcagg 660
   tataactgca ggaacaaat tgaacatcat tctatcaata caacacaaac acaacacaac 720
   tcaatcattt atttgacaac acaactaaac aaccatg 757

```

45 &lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 815

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

50 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial:

Secuencia del vector pPARTE entre los sitios EcoRI y SacI.

&lt;400&gt; 9

```

55  gaattctata tataggaagt tcatttcatt tggagccccc caaccctacc accaccacca 60
   ccaccaacct ctccctcaca caacacacac acaacagatc tcccccatcc tccctcccgt 120
   cgcgccgcgc aacacctggt aagatggctg tgcgctcaga tatatatagt gatatgcact 180
   acaaagatca taactagacc gccgcctccc cccccccccc tctctacctt ctctctttct 240
   ttctccgttt tttttttccg tctcgtctcg atctttggcc ttggtagttt gggggcgaga 300
60  ggcggtctcg tcgcccagat cgggtgcgctg ttttttatth ggaggggcgg gatctcgcgg 360
   ctgggtctcg gcgtgcggcc ggattctcgc ggggaatggg gctctcggat gtggatctga 420
   tccgccgttg ttgggggaga tatggggcgt ttaaaatttc gccatgctaa acaagatcag 480

```

- 5 gaagagggga aaagggcact atgggttaat ttttatatat ttctgctgct gctcgtcagg 540  
 attagatgtg cttgatcttt ctttcttctt tttgtgggta gaatttgaat ccctcagcat 600  
 tgttcatcgg tagtttttct tttgtcgatg ctcaccctgt tgtttggtgt ttttatacta 660  
 gtggctatcc tgacacggtc tctttgtcaa atatctctgt gtgcaggat aactgcagga 720  
 aacaaattga acatcattct atcaatacaa cacaacaca acacaactca atcatttatt 780  
 tgacaacaca actaaacaac catggtctag agctc 815
- 10 <210> 10  
 <211> 184  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Fragmento sintético En-Ac1.
- 20 <400> 10  
 atcaccgtga gttgtccgca ccaccgcacg tctcgagcc aaaaaaaaaa aaagaaagaa 60  
 aaaaaagaaa aagaaaaaac agcaggtggg tccgggtcgt gggggccgga aaagcgagga 120  
 ggatcgcgag cagcgacgag gccggccctc cctccgcttc caaagaaacg ccccccatca 180  
 attc 184
- 25 <210> 11  
 <211> 94  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Fragmento sintético En-Ac2.
- 35 <400> 11  
 aagcttgata tccatagcaa gccagccca acccaaccca acccaaccca cccagtgca 60  
 gccaaactggc aaatagtctc cacaccccg cact 94
- 40 <210> 12  
 <211> 1087  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Secuencia del vector pAPARTE entre los sitios HindIII y SacI.
- 50 <400> 12  
 aagcttgata tccatagcaa gccagccca acccaaccca acccaaccca cccagtgca 60  
 gccaaactggc aaatagtctc cacaccccg cactatcacc gtgagttgtc cgcaccaccg 120  
 cagctctcgc agccaaaaaa aaaaaaagaa agaaaaaaa gaaaaagaaa aaacagcagg 180  
 tgggtccggg tcgtgggggc cggaaaagcg aggaggatcg cgagcagcga cgaggccggc 240  
 cctccctccg cttccaaaga aacgcccccc atcaattcta tatataggaa gttcatttca 300  
 tttggagccc cccaacccta ccaccaccac caccaccacc tcctccttca cacaacacac 360  
 55 acacaacaga tctcccccac cctccctccc gtgcgcgcgc gcaacacctg gtaagatggc 420  
 tgtgcgctca gatatatata gtgatatgca ctacaaagat cataactaga ccgcccctc 480  
 ccccccccc cctctctacc ttctctctt ctttctcgt ttttttttc cgtctcgtct 540  
 cgatctttgg ccttggtagt ttggggcgga gaggcggtt cgtcgcccag atcggtgcgc 600  
 gtttttttat ttggaggggc gggatctcgc ggctgggtct cggcgtgcgc ccggattctc 660  
 60 gcggggaatg gggctctcgc atgtggatct gatccgccgt tgttggggga gatatggggc 720  
 gtttaaaatt tcgccatgct aaacaagagc aggaagagg gaaaaggga ctatggttta 780  
 atttttatat atttctgctg ctgctcgtca ggattagatg tgcttgatct ttctttcttc 840

5 tttttgtggg tagaatttga atccctcagc attgttcacg ggtagttttt cttttgtcga 900  
 tgctcaccct gttgttttgg gtttttatac tagtggctat cctgacacgg tctctttgtc 960  
 aaatatctct gtgtgcaggt ataactgcag gaaacaaatt gaacatcatt ctatcaatac 1020  
 aacacaaaca caacacaact caatcattta tttgacaaca caactaaaca accatgggtct 1080  
 agagctc 1087

<210> 13  
 <211> 31  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Fragmento sintético ASP.

<400> 13  
 gtcgactgac gcttcgaatg acgcacatgc c 31

20 <210> 14  
 <211> 1065  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Secuencia del vector p2AlPARTE entre los sitios KpnI y SacI.

30 <400> 14  
 ggtaccgggc cccccctcga ctgacgcttc gaatgacgca catgccatca ccgtgagttg 60  
 tccgcaccac cgcacgtctc gcagccaaaa aaaaaaaaag aaagaaaaaa aagaaaaaga 120  
 aaaaacagca ggtgggtccg ggtcgtgggg gcgggaaaag cgaggaggat cgctgacgct 180  
 35 tcgaatgacg cacatgcccg agcagcgacg aggcggccc tccctccgct tccaaagaaa 240  
 cgcccccat caattctata tataggaagt tcatttcatt tggagcccc caaccctacc 300  
 accaccacca ccaccacctc ctccttcaca caacacacac acaacagatc tcccccatcc 360  
 tccctcccggt cgcgcgcgcg aacacctggt aagatggctg tgcgctcaga tatatatagt 420  
 gatatgcact acaaagatca taactagacc gcgcctccc ccccccccc tctctacctt 480  
 ctctctttct ttctcgttt tttttttccg tctcgtctcg atctttggcc ttggtagttt 540  
 40 gggggcgaga ggcggttcg tcgcccagat cgggtgcgct ttttttattt ggaggggagg 600  
 gatctcgcg ctgggtctcg gcgtgcggcc ggattctcgc gggaatggg gctctcggt 660  
 gtggatctga tccgcggtt ttgggggaga tatggggcgt ttaaaatttc gccatgctaa 720  
 acaagatcag gaagagggga aaagggcact atggtttaat ttttatatat ttctgctgct 780  
 45 gctcgtcagg attagatgtg cttgatcttt ctttcttctt tttgtgggta gaatttgaat 840  
 ccctcagcat tgttcacggt tagtttttct tttgtcgat ctcaccctgt tgtttggtgt 900  
 ttttatacta gtggctatcc tgacacggtc tctttgtcaa atatctctgt gtgcaggat 960  
 aactgcagga aacaaattga acatcattct atcaatacaa cacaacaca acacaactca 1020  
 atcatttatt tgacaacaca actaaacaac catggtctag agctc 1065

50 <210> 15  
 <211> 1135  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Secuencia del vector p2APARTE entre los sitios SalI y SacI.

60 <400> 15  
 gtcgactgac gcttcgaatg acgcacatgc catccatagc aagcccagcc caaccacaacc 60

caaccaacc caccacagt cagccaactg gcaaatagtc tccacacccc ggcaactatca 120  
 ccgtgagttg tccgcaccac cgcacgtctc gcagccaaaa aaaaaaaaag aaagaaaaaa 180  
 aagaaaaaga aaaaacagca ggtgggtccg ggtcgtgggg gccggaaaag cgaggaggat 240  
 cgctgacgct tcgaatgacg cacatgcccg agcagcgacg aggcgggccc tccctccgct 300  
 5 tccaaagaaa cgcccccat caattctata tataggaagt tcatttcatt tggagcccc 360  
 caaccctacc accaccacca ccaccacctc ctcttcaca caacacacac acaacagatc 420  
 tcccccatcc tccctcccg cgcgcgcgc aacacctggt aagatggctg tgcgctcaga 480  
 tatatatagt gatatgcact acaaagatca taactagacc gccgcctccc ccccccccc 540  
 tctctacctt ctctctttct ttctccgttt tttttttccg tctcgtctcg atctttggcc 600  
 10 ttggtagttt gggggcgaga ggcggttcg tcgccagat cgggtgcgct ttttttattt 660  
 ggagggggcg gatctcgcg ctgggtctcg gcgtgcggcc ggattctcgc ggggaatggg 720  
 gctctcgat gtggatctga tccgcggttg ttgggggaga tatggggcgt ttaaaatttc 780  
 gccatgctaa acaagatcag gaagaggga aaagggcact atggtttaat ttttatatat 840  
 ttctgctgct gctcgtcagg attagatgtg ctgatcttt ctttcttctt tttgtgggta 900  
 15 gaatttgaat cctcagcat tgttcacg tagtttttct tttgtcgat ctcaccctgt 960  
 tgtttggtgt ttttatacta gtggctatcc tgacacggtc tctttgtcaa atatctctgt 1020  
 gtgcaggtat aactgcagga aacaaattga acatcattct atcaatacaa cacaacaca 1080  
 acacaactca atcatttatt tgacaacaca actaaacaac catggtctag agctc 1135

20  
 <210> 16  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Oligonucleótido cebador Oli-U1.

30 <400> 16  
 gaaggtaccg ccatggtcta aaggacaatt g 31

35  
 <210> 17  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

40  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Oligonucleótido cebador Oli-U2.

45 <400> 17  
 ctctcgagg gcgtttaaca ggctggc 27

50  
 <210> 18  
 <211> 186  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

55  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Fragmento sintético En-U2.

60 <400> 18  
 ggtaccgagc attgcatgtc taagttataa aaaattacca catatttttt ttgtcacact 60  
 tgtttgaagt gcagtttatc tatctttata catatattta aactttactc tacgaataat 120  
 ataatttata gtacaacaat aatatcagtg ttttagagaa tcatataaat gaacagttag 180  
 acatgg 186



<210> 19  
 <211> 563  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Secuencia del activador transcripcional derivado del gen  
 ubiquitina-1 de maíz (región -299 a -855).

10

<400> 19  
 ggtaccgagc attgcatgtc taagttataa aaaattacca catatTTTTT ttgtcacact 60  
 tgTTTTgaagt gcagTTTTatc tatctTTTata catatatttta aactTTTactc tacgaataat 120  
 ataacttata gtacaacaat aatatcagtg tTTtagagaa tcatataaat gaacagttag 180  
 15 acatggtcta aaggacaatt gagtattttg acaacaggac tctacagttt tatctTTTTta 240  
 gtgtgcatgt gttctccttt tTTTTtgca atagcttcac ctatataata cttcatccat 300  
 tttattagta catccattta gggTTtaggg ttaatggTTt ttatagacta atTTTTttag 360  
 tacatctatt ttattctatt ttagcctcta aattaagaaa actaaaactc tatttttagtt 420  
 tttttattta ataatttaga tataaaatag aataaaataa agtgactaaa aattaaacaa 480  
 20 atacccttta agaaattaaa aaaactaagg aaacattttt cttgtttcga gtagataatg 540  
 ccagcctgtt aaacgccctc gac 563

<210> 20  
 <211> 1692  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Secuencia del vector pU3ARTE entre los sitios KpnI y SacI.

30

<400> 20  
 ggtaccgagc attgcatgtc taagttataa aaaattacca catatTTTTT ttgtcacact 60  
 35 tgTTTTgaagt gcagTTTTatc tatctTTTata catatatttta aactTTTactc tacgaataat 120  
 ataacttata gtacaacaat aatatcagtg tTTtagagaa tcatataaat gaacagttag 180  
 acatggtcta aaggacaatt gagtattttg acaacaggac tctacagttt tatctTTTTta 240  
 gtgtgcatgt gttctccttt tTTTTtgca atagcttcac ctatataata cttcatccat 300  
 tttattagta catccattta gggTTtaggg ttaatggTTt ttatagacta atTTTTttag 360  
 40 tacatctatt ttattctatt ttagcctcta aattaagaaa actaaaactc tatttttagtt 420  
 tttttattta ataatttaga tataaaatag aataaaataa agtgactaaa aattaaacaa 480  
 atacccttta agaaattaaa aaaactaagg aaacattttt cttgtttcga gtagataatg 540  
 ccagcctgtt aaacgccctc gactgacgct tcgaatgacg cacatgccat ccatagcaag 600  
 cccagcccaa cccaacccaa cccaaccac ccagtgacg ccaactggca aatagtctcc 660  
 45 acaccccggc actatcaccg tgagttgtcc gcaccaccgc acgtctcgca gccaaaaaaa 720  
 aaaaaagaaa gaaaaaaaag aaaaagaaa aacagcaggt gggTccgggt cgtgggggcc 780  
 ggaaaaagcga ggaggatcgc tgacgcttcg aatgacgcac atgcccagc agcgacgagg 840  
 ccggccctcc ctccgcttcc aaagaaacgc ccccatcaa ttctatatat aggaagttca 900  
 tttcatttgg agcccccaa ccctaccacc accaccacca ccacctctc cttcacacaa 960  
 50 cacacacaca acagatctcc cccatcctcc ctccgctcgc gccgcgcaac acctggtaag 1020  
 atggctgtgc gctcagatat atatagtgat atgactaca aagatcataa ctagaccgcc 1080  
 gcctccccc cccccctct ctaccttctc tctttcttct tccgtttttt ttttccgtct 1140  
 cgtctcgatc tttggccttg gtagtttggg ggcgagaggc ggcttcgtcg cccagatcgg 1200  
 tgcgcggttt tttatttga gggcggggat ctgcgggctg ggtctcgcg tgcgggcgga 1260  
 55 ttctcgcggg gaatggggct ctcgatgtg gatctgatcc gccgttggtg ggggagatat 1320  
 gggcggttta aaatttcgcc atgctaaaca agatcaggaa gaggggaaaa gggcactatg 1380  
 gtttaatttt tatatatctc tgctgctgct cgtcaggatt agatgtgctt gatctttctt 1440  
 tcttcttttt gtgggtagaa tttgaatccc tcagcattgt tcatcggtag ttttctttt 1500  
 gtcgatgtc accctgttgt ttggtgtttt tatactagtg gctatcctga cagggtctct 1560  
 60 ttgtcaaata tctctgtgtg caggataaac tgcaggaaac aaattgaaca tcattctatc 1620  
 aatacaacac aaacacaaca caactcaatc atttatttga caacacaact aaacaacat 1680  
 ggtctagagc tc 1692

<210> 21  
 <211> 223  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 10 Fragmento sintético GLU.  
  
 <400> 21  
 ctcgagatac atattaagag tatggacaga catttcttta acaaactcca tttgtattac 60  
 tccaaaagca ccagaagttt gtcattggctg agtcatgaaa tgtatagttc aatcttgcaa 120  
 15 agttgccttt ccttttgtac tgtgttttaa cactacaagc catatattgt ctgtacgtgc 180  
 aacaaactat atcaccatgt atcccaagat gcttttttaa ttc 223  
  
 <210> 22  
 20 <211> 1032  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:  
 Secuencia del vector pGATE entre los sitios XhoI y SacI.  
  
 <400> 22  
 30 ctcgagatac atattaagag tatggacaga catttcttta acaaactcca tttgtattac 60  
 tccaaaagca ccagaagttt gtcattggctg agtcatgaaa tgtatagttc aatcttgcaa 120  
 agttgccttt ccttttgtac tgtgttttaa cactacaagc catatattgt ctgtacgtgc 180  
 aacaaactat atcaccatgt atcccaagat gcttttttaa ttctatata aggaagttca 240  
 tttcatttgg agcccccaa ccctaccacc accaccacca ccacctctc cttcacaca 300  
 cacacacaca acagatctcc cccatcctcc ctcccgtcgc gccgcgcaac acctggttaag 360  
 35 atggctgtgc gctcagatat atatatgtat atgcaactaca aagatcataa ctagaccgcc 420  
 gcctccccc cccccctct ctacctctc tctttcttcc tccgtttttt tttccgtct 480  
 cgtctcgatc tttggccttg gtagtttggg ggcgagaggc ggcttcgtcg cccagatcgg 540  
 tgccggtttt tttatttggg ggggcgggat ctgcggtgct ggtctcggcg tgcggccgga 600  
 ttctcgcggg gaattgggct ctcgatgtg gatctgatcc gccgttgttg ggggagatat 660  
 40 ggggcgttta aaatttcgcc atgctaaaca agatcaggaa gaggggaaaa gggcactatg 720  
 gtttaatttt tatatatttc tgctgctgct cgtcaggatt agatgtgctt gatctttctt 780  
 tcttcttttt gtgggtagaa tttgaatccc tcagcattgt tcatcggtag ttttctttt 840  
 gtcgatgctc accctgttgt ttggtgtttt tatactagtg gctatcctga caccgtctct 900  
 ttgtcaaata tctctgtgtg caggtataac tgcaggaaac aaattgaaca tcattctatc 960  
 45 aatacaacac aaacacaaca caactcaatc atttatttga caacacaact aaacaacat 1020  
 ggtctagagc tc 1032

50

## REIVINDICACIONES

- 1) Un promotor artificial caracterizado porque es una molécula de ADN recombinante que promueve en células vegetales la expresión de cualquier secuencia de ADN fusionada a su extremo 3', y que se compone de:
  - a) un elemento 5' regulador de la transcripción seguido de,
  - b) un núcleo promotor artificial que comprende una caja TATA, una secuencia nucleotídica con un contenido de GC menor de 64% y un sitio de iniciación de la transcripción, que en su 3' se une a,
  - 10 c) una secuencia nucleotídica sintética transcribible y no traducible, conformada por un primer Exón quimérico, un Intrón artificial capaz de potenciar en células vegetales la expresión de los genes fusionados a él, y un segundo Exón quimérico con propiedades potenciadoras de la traducción de cualquier gen insertado a continuación del mismo.
- 2) Un promotor artificial caracterizado porque es una molécula de ADN recombinante  
15 según la reivindicación 1 donde el elemento 5' regulador de la transcripción es artificial.
- 3) Un promotor artificial caracterizado porque es una molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1 donde el elemento 5' regulador de la transcripción es homólogo a una secuencia de ADN que de forma natural estimula y/o regula la expresión génica en células de plantas.
- 20 4) Un promotor artificial según la reivindicación 3, caracterizado porque el elemento 5' regulador de la transcripción proviene del gen actina-1 de arroz.
- 5) Un promotor artificial según la reivindicación 4, donde el elemento 5' regulador de la transcripción comprende un fragmento de la región de -43 a -310 a partir del inicio de transcripción del gen actina-1 de arroz.
- 25 6) Un promotor artificial según la reivindicación 5 cuya secuencia nucleotídica del elemento 5' regulador de la transcripción se corresponda con la secuencia SEQ ID NO: 10 ó con un fragmento de ella.
- 7) Un promotor artificial según la reivindicación 5, cuya secuencia nucleotídica del elemento 5' regulador de la transcripción se corresponda con la secuencia SEQ ID NO: 11 ó  
30 con un fragmento de ella.
- 8) Un promotor artificial según la reivindicación 3, caracterizado porque el elemento 5' regulador de la transcripción proviene del gen ubiquitina-1 de maíz.

- 9) Un promotor artificial según la reivindicación 8, donde el elemento 5' regulador de la transcripción comprende un fragmento de la región de -299 a -855 a partir del inicio de transcripción del gen ubiquitina-1 de maíz.
- 10) Un promotor artificial según la reivindicación 9, cuya secuencia nucleotídica del elemento 5' regulador de la transcripción se corresponda con la secuencia SEQ ID NO: 19 6 con un fragmento de ella.
- 11) Un promotor artificial según las reivindicaciones 2 y 3 donde el elemento 5' regulador de la transcripción es un potenciador transcripcional tipo as-1.
- 12) Un promotor artificial según la reivindicación 11, donde la secuencia nucleotídica del potenciador transcripcional tipo as-1 es esencialmente idéntica a la secuencia del fragmento que corresponde a los nucleótidos del 7 al 26 en la SEQ ID NO: 13, o a su secuencia complementaria.
- 13) Un promotor artificial según la reivindicación 3 donde el elemento 5' regulador de la transcripción provenga de un promotor de origen viral.
- 14) Un promotor artificial según la reivindicación 13, donde el elemento 5' regulador de la transcripción proviene del promotor 35S del CaMV.
- 15) Un promotor artificial según la reivindicación 2 y 3 caracterizado porque el elemento 5' regulador de la transcripción controla la expresión génica en las células vegetales de forma temporal, órgano o tejido específica.
- 16) Un promotor artificial según la reivindicación 15 caracterizado porque el elemento 5' regulador de la transcripción controla la expresión génica en semillas.
- 17) Un promotor artificial según la reivindicación 16 donde el elemento 5' regulador de la transcripción proviene del gen glutelina B-1 de arroz.
- 18) Un promotor artificial según la reivindicación 17, donde el elemento 5' regulador de la transcripción comprende un fragmento de la región de -31 a -245 a partir del inicio de transcripción del gen glutelina B-1 de arroz.
- 19) Un promotor artificial según la reivindicación 18 caracterizado porque la secuencia nucleotídica del elemento 5' regulador de la transcripción se corresponda con la secuencia SEQ ID NO: 21 o con un fragmento de ella.
- 20) Un promotor artificial según la reivindicación 15 cuyo elemento 5' regulador de la transcripción controla la expresión génica en células vegetales sometidas a condiciones de estrés biótico o abiótico.
- 21) Un promotor artificial según la reivindicación 15, cuyo elemento 5' regulador de la transcripción controla la expresión génica en tejidos vegetales que han sufrido heridas.

- 22) Un promotor artificial según la reivindicación 1 cuya región 5' reguladora de la transcripción se compone de dos o más elementos reguladores de diferentes orígenes operativamente acoplados, y que individualmente responden a alguna de las características señaladas en las reivindicaciones de la 2 a la 21.
- 5 23) Un promotor artificial según la reivindicación 1 cuyo primer Exón componente de la región artificial Exón/Intrón/Exón contiene motivos de secuencias con alto contenido de C y A.
- 24) Un promotor artificial según la reivindicación 1 cuyo primer Exón componente de la región artificial Exón/Intrón/Exón contiene secuencias donde se repite con frecuencia el  
10 motivo CTCC y/o sus secuencias homólogas CTC, TCC y TC.
- 25) Un promotor artificial según la reivindicación 1, cuyo Intrón componente de la región artificial Exón/Intrón/Exón contiene secuencias donde se repite con frecuencia el motivo CTCC y/o sus secuencias homólogas CTC, TCC y TC.
- 26) Un promotor artificial según las reivindicaciones de la 23 a la 25, cuya secuencia  
15 nucleotídica de la región artificial Exón/Intrón/Exón se corresponda con la secuencia SEQ ID NO: 6 o con un fragmento de ella .
- 27) Un promotor artificial según la reivindicación 1 cuyo segundo Exón componente de la región artificial Exón/Intrón/Exón contiene motivos de secuencias con alto contenido de C y A.
- 20 28) Un promotor artificial según la reivindicación 1, donde el segundo Exón componente de la región artificial Exón/Intrón/Exón contiene al menos una secuencia en más de un 83% homóloga al motivo HCAYYY (H= C ó T ó A; Y= C ó T).
- 29) Un promotor artificial según las reivindicaciones 27 y 28, caracterizado porque la secuencia nucleotídica del segundo Exón componente de la región artificial  
25 Exón/Intrón/Exón se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 30) Un promotor artificial según las reivindicaciones de la 23 a la 29, caracterizado porque la secuencia nucleotídica de la región artificial Exón/Intrón/Exón se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 8 o con un fragmento de ella.
- 31) Un promotor artificial que responda a alguna de las reivindicaciones de la 1 a la 30, y  
30 que al menos parcialmente se corresponda con la secuencia SEQ ID NO: 20.
- 32) Un fragmento de ADN de un promotor artificial según las reivindicaciones de la 1 a la 31, que fusionado a cualquier promotor funcional en células de plantas, contribuya a potenciar la expresión de las secuencias de ADN controladas por este promotor.

- 33) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 32, con capacidad potenciadora de la traducción de los genes fusionados a él.
- 34) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 33, que contenga al menos un fragmento de secuencia en más de un 83% homóloga al motivo HCAYYY (H= C ó T ó A; Y= C ó T).
- 35) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 33, que contenga motivos de secuencias con alto contenido de C y A.
- 36) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 33, cuya secuencia nucleotídica se corresponda con la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 37) Un fragmento de un promotor artificial según las reivindicaciones de la 33 a la 36, que en células vegetales contribuya a aumentar la traducción de cualquier ARNm producido a partir del promotor 35S del CaMV.
- 38) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 32 que se corresponda con una región Exón/Intrón/Exón.
- 39) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 38, cuyo primer Exón contiene motivos de secuencias con alto contenido de C y A.
- 40) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 38, cuyo primer Exón contiene secuencias donde se repite con frecuencia el motivo CTCC y/o sus secuencias homólogas CTC, TCC y TC.
- 41) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 38, cuyo Intrón contiene secuencias donde se repite con frecuencia el motivo CTCC y/o sus secuencias homólogas CTC, TCC y TC.
- 42) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 38, cuya secuencia nucleotídica se corresponda con la secuencia SEQ ID NO: 6.
- 43) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 38, cuya secuencia nucleotídica se corresponda con la secuencia SEQ ID NO: 8.
- 44) Un fragmento de un promotor artificial según las reivindicaciones de la 38 a la 43, que en células vegetales contribuya a aumentar la expresión de cualquier gen puesto bajo el control del promotor 35S del CaMV.
- 45) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 32, que se corresponda con un potenciador transcripcional tipo as-1.
- 46) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 45, cuya secuencia nucleotídica sea esencialmente idéntica a la secuencia del fragmento que corresponde a los nucleótidos del 7 al 26 en la SEQ ID NO: 13, o a su secuencia complementaria.

- 47) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 32, que se corresponda con un elemento 5' regulador de la transcripción.
- 48) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 47, cuyo elemento 5' regulador de la transcripción provenga del gen actina-1 de arroz.
- 5 49) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 48, cuya secuencia nucleotídica comprende un fragmento de la región de -43 a -310 a partir del inicio de transcripción del gen actina-1 de arroz.
- 50) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 49, cuya secuencia nucleotídica se corresponda con la secuencia SEQ ID NO: 10 o con un fragmento de ella.
- 10 51) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 49, cuya secuencia nucleotídica se corresponda con la secuencia SEQ ID NO: 11 o con un fragmento de ella.
- 52) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 47, cuyo elemento 5' regulador de la transcripción provenga del gen ubiquitina-1 de maíz.
- 53) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 52, cuya secuencia nucleotídica comprende un fragmento de la región de -299 a -855 a partir del inicio de transcripción del gen ubiquitina-1 de maíz.
- 15 54) Un fragmento de un promotor artificial según la reivindicación 53, cuya secuencia nucleotídica se corresponda con la secuencia SEQ ID NO: 19 o con un fragmento de ella.
- 55) Un casete para la expresión de secuencias de ADN en células vegetales conteniendo un promotor artificial que responde a alguna de las reivindicaciones de la 1 a la 31.
- 20 56) Un casete para la expresión de secuencias de ADN en células vegetales conteniendo un elemento promotor de la transcripción funcionalmente unido a un fragmento de ADN que responde a alguna de las reivindicaciones de la 32 a la 54.
- 57) Un vector de ADN para la transformación de células vegetales conteniendo uno de los casetes de expresión caracterizados en las reivindicaciones 55 ó 56.
- 25 58) Una célula bacteriana portadora del vector de la reivindicación 57, y su descendencia.
- 59) Una célula vegetal transformada con el vector de la reivindicación 57, y su descendencia.
- 60) Una célula vegetal según la reivindicación 59, que expresa el fragmento de ADN que se encuentra bajo el control del promotor artificial contenido en el casete de expresión que fue introducido mediante el vector descrito en la reivindicación 57.
- 30 61) Una célula vegetal según la reivindicación 59, con el casete de expresión caracterizado en la reivindicación 55 ó 56 establemente integrado a su genoma.

- 62) Una planta transgénica regenerada a partir de la célula vegetal caracterizada en la reivindicación 61.
- 63) Una planta transgénica según la reivindicación 62, que expresa el fragmento de ADN que se encuentra bajo el control del promotor artificial contenido en el casete de expresión que fue introducido mediante el vector descrito en la reivindicación 57.
- 64) La descendencia de las plantas transgénicas caracterizadas en la reivindicación 63.
- 65) Las plantas de la reivindicación 64 que sean dicotiledóneas.
- 66) Las plantas de la reivindicación 65 que sean solanáceas.
- 67) Las plantas de la reivindicación 66 que pertenezcan a una de las siguientes especies: tabaco, tomate o papa.
- 68) Las plantas de la reivindicación 64 que sean monocotiledóneas.
- 69) Las plantas de la reivindicación 68 que sean gramíneas.
- 70) Las plantas de la reivindicación 69 que pertenezcan a una de las siguientes especies: arroz, caña de azúcar, maíz, trigo o cebada.
- 71) La purificación y utilización de la proteína recombinante que producen las células o las plantas de las reivindicaciones 60 ó 63, como resultado de la expresión del fragmento de ADN que se encuentra bajo el control del promotor artificial contenido en el casete de expresión que fue introducido mediante el vector descrito en la reivindicación 57.





Figura 3.



Figura 4.

caja TATA inicio de transcripción  
ctatatataggaagttcatttcatttggagcccccaaccctACCACCACCACCACCACCT  
EXÓN  
CCTCCTTCACACAACACACACAACAGATCTCCCCATCCTCCCTCCCGTCGCGCCGCGCAAC  
*Bgl II*  
ACCTGgtaagatggctgtgcgctcagatatatatagtgatatgcactacaaagatcataactag  
intrón  
accgcgccctccccccccccccctctctaccttctctctttctttctcgttttttttttccgt  
ctcgtctcgatctttggccttggtagtttgggggagagaggcggttcgtcgccagatcggtg  
cgcggttttttatattggaggggaggatctcgcggtgggtctcgcggtgcggccggattctcg  
cggggaatggggctctcgatgtggatctgatccgccgttggtggggagatatggggcggtta  
aaatttcgcatgctaacaagatcaggaagaggggaaaagggcactatgggttaatttttata  
tatttctgctgctgctcgtcaggattagatgtgcttgatctttctttctttttgtgggtag  
aatttgaatccctcagcattgttcacggtagttttcttttgcgatgctcaccctgttggtt  
gggtgtttttatactagtggtatcctgacacgggtctctttgtcaaatactctgtgtgcagGTA  
*Spe I*  
TAACTGCAGGAAACAAATTGAACATCATTCTATCAATACAACACAAACACAACACAACACTCAATC  
*Pst I* *EUREKA*  
ATTTATTTGACAACACAACATAACAACCATGGTCTAGAGCTC  
*Nco I Xba I Sac I*

Figura 5.

ATCCATAGCAAGCCCAGCCCAACCCAACCCAACCCAACCCACCCCAGTGCAGCCAACTGGCAAA  
TAGTCTCCACACCCCGGCACTATCACCGTGAGTTGTCCGCACCACCGCACGTCTCGCAGCCAAA  
AAAAAAAAAAGAAAGAAAAAAAAAGAAAAAGAAAAACAGCAGGTGGGTCCGGGTCTGTTGGGGGCC  
GGAAAAGCGAGGAGGATCGCGAGCAGCGACGAGGCCGGCCCTCCCTCCGCTTCCAAAGAAACGC  
*NruI*  
CCCCATCAATTctatatataggaagttcatttcatttggagcccccaaccctACCACCACCA  
CCACCACACCTCCTCCTTCACACAACACACACACAACAGATCTCCCCATCCTCCCTCCCGTC  
*BglII*  
GCGCCGCGCAACACCTGgtaagatggctgtgctgcgtcagatatatatagtgatatgcactacaaa  
gatcataactagaccgcgcctccccccccccccctctctaccttctctctttctttctcgtt  
tttttttccgtctcgtctcgtatctttggccttggtagtttggggcgagaggcggttcgtcg  
cccagatcgggtgcgcgtttttttatgttgagggggcggtatctcgcggctgggtctcggcgtgcg  
gccggattctcgcggggaatggggctctcggtatgtggatctgatccgccgttggtgggggagat  
atggggcggtttaaaatttcgccatgctaaacaagatcaggaagaggggaaaagggcactatggt  
ttaatttttatatatattctgctgctgctcgtcaggattagatgtgcttgatctttctttcttct  
ttttgtgggtagaatttgaatccctcagcattgttcacgcgtagttttcttttgtcgatgctc  
accctgttggttggtgtttttatactagtggctatcctgacacggtctctttgtcaaatatctc  
*SpeI*  
tgtgtgcagGTATAACTGCAGGAAACAAATTGAACATCATTCTATCAATACAACACAAACACAA  
*PstI*  
CACAACCTCAATCATTTATTGACAACACAACCTAAACAACCATGGTCTAGAGCTC  
*NcoI XbaI SacI*

Figura 6.

GGTACCGAGCATTGCATGTCTAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTCCACTTGT  
TGAAGTGCAGTTTATCTATCTTTATACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTA  
TAGTACAACAATAATATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAA  
GGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTC  
CTTTTTTTTTTGCAATAGCTTCACCTATATAACTTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTA  
GGGTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAG  
CCTCTAAATTAAGAAACTAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAAT  
AGAATAAAATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAACTAAGGAA  
ACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTAAACGCCCTCGACTGACGCTTCGAAT  
GACGCACATGCCATCCATAGCAAGCCCAGCCCAACCCAACCCAACCCAACCCACCCAGTGCAG  
CCAAGTGGCAAATAGTCTCCACACCCCGGCACTATCACCGTGAGTTGTCCGCACCACCGCACGT  
CTCGCAGCCAAAAAAGAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAACAGCAGGTGGGTCCGG  
GTCGTGGGGGCCGGAAGCGAGGAGGATCGCTGACGCTTCGAATGACGCACATGCCCGAGCAG  
CGACGAGGCCGGCCCTCCCTCCGCTTCCAAAGAAACGCCCCCATCAATTctatatataggaag  
ttcattttcatttgagcccccaaccctaccaccaccaccaccacacctctccttcacacaa  
cacacacacacagatctccccatcctccctcccgctcgcgccgcaacacctggtaagatgg  
ctgtgcgctcagatatatatagtgatgactacaaagatcataactagaccgcccctcccc  
ccccccccctctctaccttctctctttcttctccgtttttttttccgtctcgtctcgatctt  
tggccttggtagtttggggcgagaggcggttcgtcgccagatcggtgcggtttttttatt  
tggaggggcggtatctcgcggtgggtctcggtcgccggttctcgcggggaatggggct  
ctcggtatggtatctgatccgcttgttgggggagatatggggcgtttaaaatttcgcatgc  
taaacaagatcaggaagaggggaaaagggcactatggtttaatttttatatatttctgctgctg  
ctcgtcaggattagatgtgcttgatctttctttctttttgtgggtagaatttgaaatccctc  
agcattgttcacggtagtttttcttttctcgatgctcaccctgttgggtgtttttatact  
agtggctatcctgacacggtctctttgtcaaatactctgtgtgcaggtataactgcaggaac  
aaattgaacatcattctatcaatacaacacacacacacactcaatcattttatttgacaac  
acaactaaacaaccatgggtctagagctc

Figura 7.

A



B



C



D



E



F



G



H

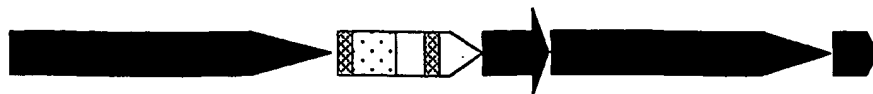
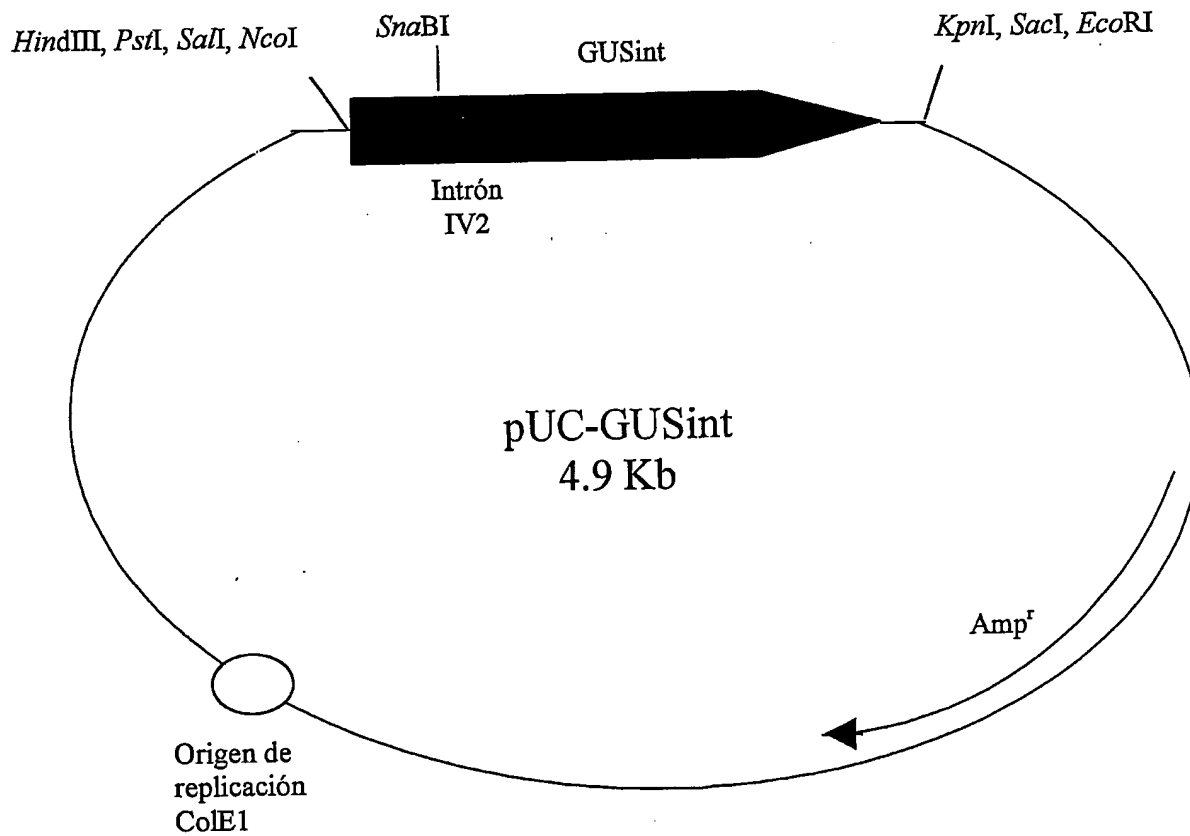


Figura 8.

CTCGAGATACATATTAAGAGTATGGACAGACATTTCTTTAACAAACTCCATTTGTATTACTCCA  
AAAGCACCAGAAGTTTGTTCATGGCTGAGTCATGAAATGTATAGTTCAATCTTGCAAAGTTGCCT  
TTCTTTTGTACTGTGTTTAACTACAAGCCATATATTGTCTGTACGTGCAACAACTATAT  
CACCATGTATCCCAAGATGCTTTTTTAATTctatatataggaagttcatttcatttggagcccc  
ccaaccctACCACCACCACCACCACCACCTCCTTCACACAACACACACACAACAGATCTCC  
CCCATCCTCCCTCCCGTCGCGCCGCGCAACACCTGgtaagatggctgtgctgcgctcagatatatat  
agtgatatgcactacaaagatcataactagaccgcccgcctccccccccccctctctaccttc  
tctctttctttctcgcgttttttttttccgtctcgtctcgatctttggccttggtagtttgggg  
cgagaggcggcttcgtcgccagatcggtgcgctttttttatttgaggggcgggatctcgcg  
gctgggtctcggcgtgcggccggattctcgcggggaatggggctctcggtatgtggatctgatcc  
gccgttggtgggggagatatggggcgtttaaaatttcgccatgctaacaagatcaggaagagg  
ggaaaagggcactatggtttaatttttatataatttctgctgctgctcgtcaggattagatgtgc  
ttgatctttctttctttctttttgtgggtagaatttgaatccctcagcattgttcacggtagtt  
tttcttttgtcgatgctcaccctgttggttggtgtttttatactagtggctatcctgacacggt  
ctctttgtcaaatatctctgtgtgcagGTATACTGCAGGAAACAAATTGAACATCATTCTATC  
AATACAACACAAACACAACACAACACTCAATCATTTATTTGACAACACAACATAACCAACCATGGTC  
TAGAGCTC  
*Xba I Sac I* *Nco I*

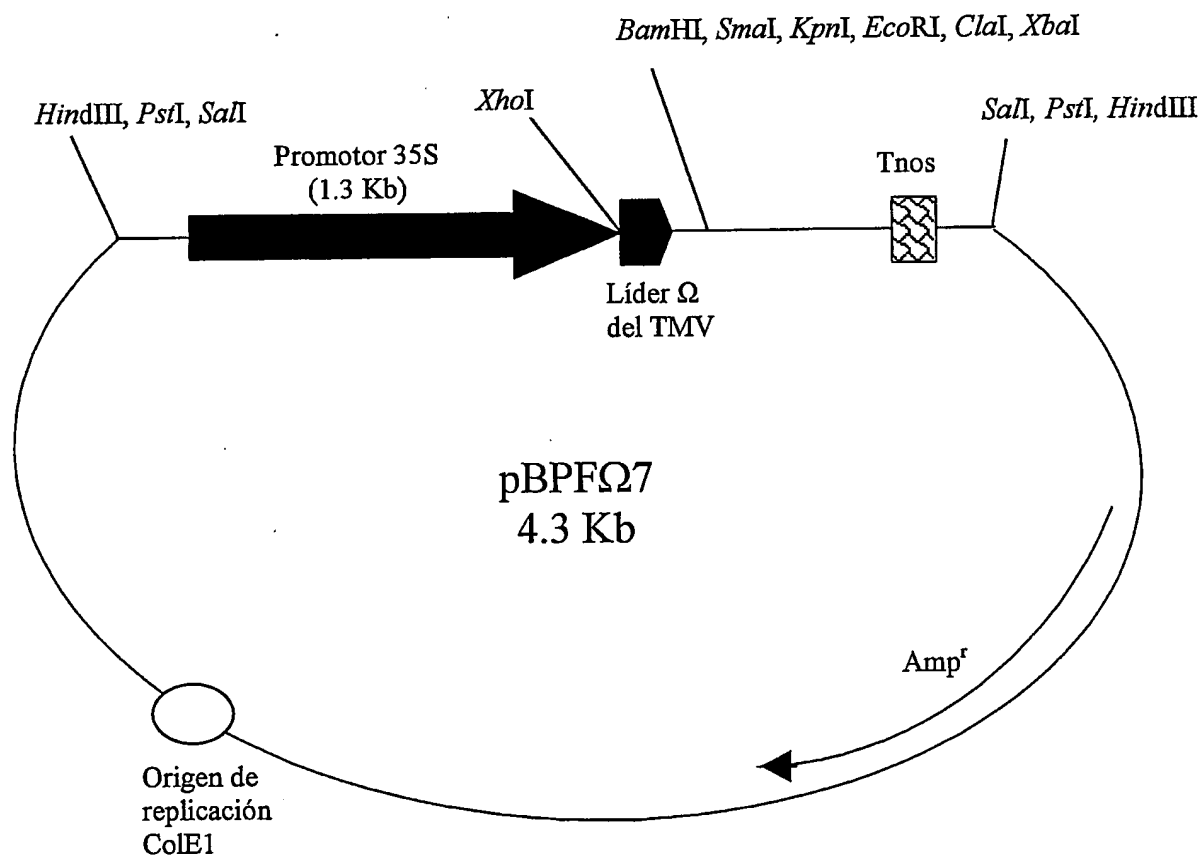
Figura 9.





9/11

Figura 10.



10/11

Figura 11.

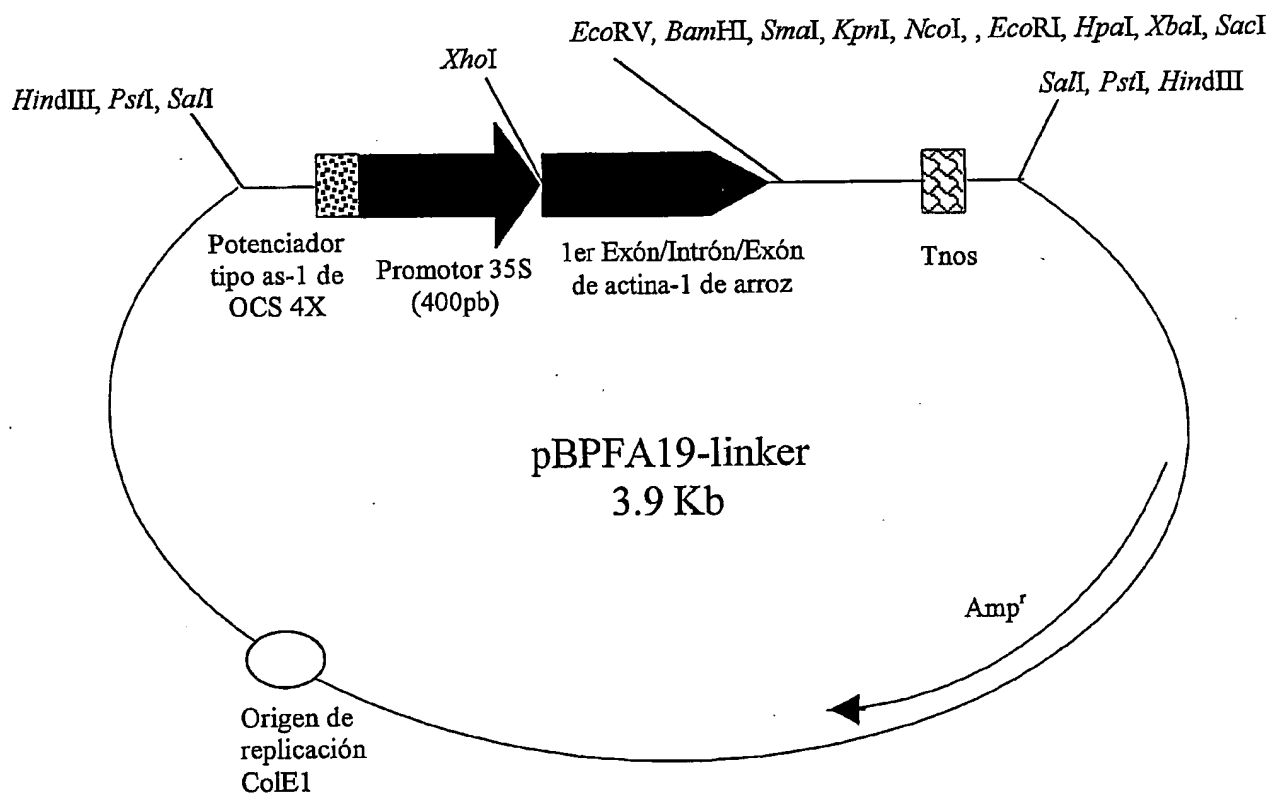
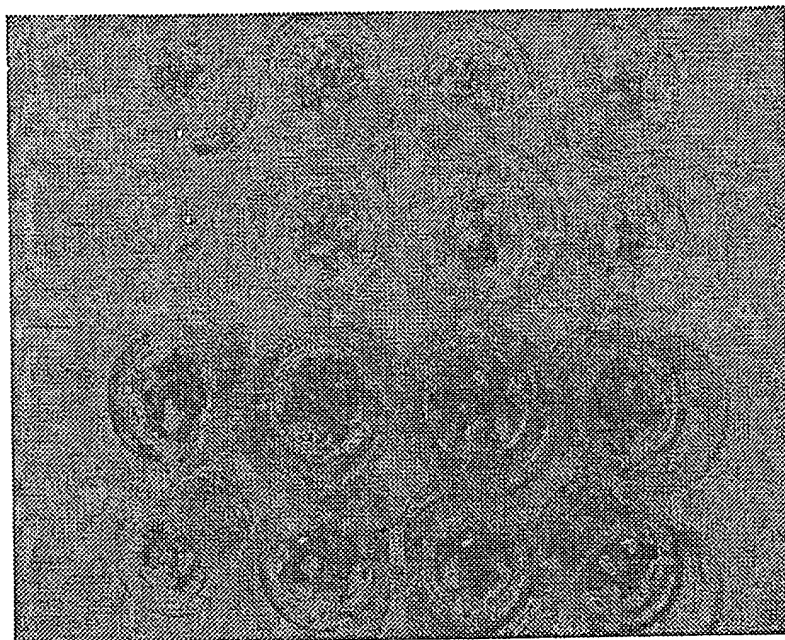


Figura 12.



pBPFA19GUSint

pBPFO-GUSint

pA19ARTEGUSint

pA19ARTGUSint

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**